

# sebia

## MINICAP Hb A1c

Ref. 2215

IVD



2013/01

## UTILISATION

Le kit MINICAP Hb A1c permet la séparation et la quantification de la fraction glyquée HbA<sub>1c</sub> de l'hémoglobine du sang humain par électrophorèse capillaire en milieu basique (pH 9,4) sur l'instrument MINICAP FLEX-PIERCING.

MINICAP FLEX-PIERCING est un automate qui permet de réaliser toutes les séquences de l'électrophorèse jusqu'à l'obtention du profil des hémoglobines pour l'analyse quantitative de la fraction HbA<sub>1c</sub>. Les hémoglobines, séparées dans des capillaires en silice fondue, sont détectées directement au niveau d'une cellule sur le capillaire par spectrophotométrie d'absorbance à 415 nm, longueur d'onde d'absorption spécifique des hémoglobines.

L'analyse est réalisée sur l'hémolysat de globules rouges du sang total prélevé sur anticoagulant contenant de l'EDTA<sub>K<sub>2</sub></sub> ou EDTA<sub>K<sub>3</sub></sub>.

Le dosage de l'HbA<sub>1c</sub> permet de juger de l'efficacité des traitements à moyen terme du contrôle du glucose sanguin des patients diabétiques.

La technique MINICAP Hb A1c réalisée avec l'instrument MINICAP FLEX-PIERCING est conforme à la standardisation NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program).

À usage *in vitro* exclusivement.

## PRINCIPE DU TEST

La glycation de l'hémoglobine est une réaction non enzymatique qui se produit entre le glucose intra-érythrocytaire et l'extrémité N-terminale des chaînes β de l'hémoglobine, et cela, tout au long de la vie du globule rouge. La proportion de cette hémoglobine glyquée est donc fonction de la glycémie, dans la mesure où le taux de glucose intra-érythrocytaire ne dépend pas de l'insuline, mais uniquement de la glycémie. Elle s'accumule dans les hématies durant les 120 jours de leur existence.

Le dosage de ces hémoglobines glyquées représente donc "l'intégration" des variations glycémiques pendant les semaines précédant le prélèvement. Il peut être utilisé comme index de contrôle du diabète sucré et permet ainsi de juger de l'efficacité des traitements à moyen terme.

L'électrophorèse est une analyse très utile en laboratoire d'analyses cliniques pour la mesure des composants des liquides biologiques, dont l'hémoglobine glyquée HbA<sub>1c</sub>. Parallèlement aux techniques d'électrophorèse sur différents supports, dont le gel d'agarose et la chromatographie, la technique d'électrophorèse capillaire s'est développée car elle offre l'avantage d'une automatisation complète de l'analyse, de séparations rapides et d'une bonne résolution. Elle se définit comme une technique de séparation électrocinétique effectuée dans un tube de diamètre interne inférieur à 100 µm rempli d'un tampon composé d'électrolytes. Par de nombreux aspects, elle se présente comme un intermédiaire entre l'électrophorèse classique de zone sur support et la chromatographie liquide.

L'instrument MINICAP FLEX-PIERCING utilise le principe de l'électrophorèse capillaire en solution libre, qui représente la forme la plus courante de l'électrophorèse capillaire. Il permet la séparation de molécules chargées en fonction de leur mobilité électrophorétique propre dans un tampon de pH donné, et, selon le pH de l'électrolyte, d'un flux électro-osmotique plus ou moins important.

L'instrument MINICAP FLEX-PIERCING comprend 2 capillaires en parallèle, permettant 2 analyses simultanées pour la quantification de la fraction HbA<sub>1c</sub> du sang total. L'injection dans les capillaires de l'échantillon dilué dans la solution hémolysante est effectuée à l'anode par aspiration. La séparation est ensuite réalisée en appliquant une différence de potentiel de plusieurs milliers de volts aux bornes de chaque capillaire.

La détection directe des hémoglobines est effectuée côté cathode à 415 nm, longueur d'onde d'absorption spécifique des hémoglobines ; elle permet une quantification précise de la fraction HbA<sub>1c</sub> de l'hémoglobine. Les capillaires sont lavés avant chaque analyse par une solution de lavage, puis par le tampon d'analyse.

La haute résolution de la technique MINICAP Hb A1c permet la quantification précise de l'HbA<sub>1c</sub>, en particulier en présence d'HbA<sub>1c</sub> labile, d'hémoglobines carbamylées et acétylées, et des principaux variants de l'hémoglobine.

Avec le tampon utilisé à pH basique, l'ordre de migration des hémoglobines normales et anormales (ou variants) est le suivant, de la cathode vers l'anode : A2/C, E, S/D, F, A0, autres Hb (dont Hb A1 mineure) et A1c.

## RÉACTIFS FOURNIS DANS LE KIT MINICAP Hb A1c

**ATTENTION : Voir les fiches de données de sécurité.**

| COMPOSANTS                                  | RÉF. N° 2215               |
|---------------------------------------------|----------------------------|
| Tampon (prêt à l'emploi)                    | 2 flacons de 250 mL        |
| Solution hémolysante (prête à l'emploi)     | 1 flacon de 225 mL         |
| Solution de lavage (solution concentrée)    | 1 flacon de 25 mL          |
| Cupules réactif                             | 1 sachet de 125            |
| Filtres                                     | 3 filtres                  |
| Boîtes pour cupules usagées                 | 4 boîtes                   |
| Étiquettes code-barres solution hémolysante | 5 planches de 4 étiquettes |

*Durant le transport, le kit peut rester à température ambiante (entre 15 et 30 °C) pendant 15 jours sans que cela n'affecte la qualité du test.*

### POUR DES RÉSULTATS OPTIMUMS

*Les éléments d'un même kit doivent être utilisés ensemble et selon les instructions de la notice.*

**LIRE ATTENTIVEMENT LA NOTICE D'UTILISATION.**

**ATTENTION : Ne pas utiliser d'eau déminéralisée du commerce, eau pour fer à repasser par exemple (risque de détérioration importante des capillaires). Utiliser exclusivement de l'eau de qualité ultrapure, type eau pour préparation injectable.**

## 1. TAMPON

### Préparation

Le tampon est prêt à l'emploi. Il contient : tampon pH  $9,4 \pm 0,5$  ; composants sans danger aux concentrations utilisées nécessaires pour des performances optimales.

### Utilisation

Tampon pour l'analyse de l'HbA<sub>1c</sub> en électrophorèse capillaire.

### Conservation, stabilité et signes de détérioration

Le tampon doit être conservé au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C). Il est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le kit ou sur l'étiquette du flacon de tampon. Ne pas stocker le tampon à température ambiante, à proximité d'une fenêtre ou d'une source de chaleur.

NE PAS CONGELER.

**IMPORTANT** : Après conservation à 2 – 8 °C et avant toute utilisation, il est nécessaire de ramener la température du tampon à la température ambiante, ce qui nécessite environ 3 heures pour un flacon de tampon plein. Si cette précaution n'est pas respectée, les performances de la technique peuvent être affectées.

**ATTENTION** : Ne pas préchauffer le tampon au bain-marie.

Après chaque utilisation, le tampon doit impérativement être conservé au réfrigérateur à 2 – 8 °C dans les plus brefs délais, il est alors stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette du flacon de tampon.

En cas d'utilisation d'un flacon de tampon dans un délai prévisionnel de 20 jours, il est possible de le conserver à température ambiante.

Un flacon de tampon entamé, installé sur MINICAP FLEX-PIERCING, est stable au maximum **20 jours** (cumulés) à température ambiante (de 15 à 30 °C).

**IMPORTANT** : Le temps cumulé du tampon passé à température ambiante ne doit pas excéder **20 jours**. Cette durée de conservation de 20 jours tient compte de la durée de remise à température ambiante du tampon.

Éliminer le tampon s'il y a un changement d'aspect ou apparition d'un trouble dû à une contamination microbienne, d'un précipité ou de particules en suspension.

*NOTE* : Au cours du temps, une légère coloration du tampon peut être observée sans que cela n'affecte la qualité du test.

## 2. SOLUTION HÉMOLYSANTE

### Préparation

La solution hémolysante est prête à l'emploi. Elle contient : composants sans danger aux concentrations utilisées, nécessaires pour des performances optimales.

### Utilisation

Pour la dilution et l'hémolyse du sang total.

### Conservation, stabilité et signes de détérioration

La solution hémolysante peut être conservée à température ambiante (de 15 à 30 °C) ou au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C). Elle est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le kit ou sur l'étiquette du flacon de solution hémolysante. NE PAS CONGELER.

Éliminer la solution hémolysante s'il y a un changement d'aspect ou apparition d'un trouble dû à une contamination microbienne, d'un précipité ou de particules en suspension.

*NOTE* : Au cours du temps, un léger jaunissement de la solution hémolysante peut être observé sans que cela n'affecte la qualité du test.

## 3. SOLUTION DE LAVAGE

### Préparation

Le flacon de solution de lavage concentrée doit être complété à 250 mL avec de l'eau distillée ou déminéralisée.

Après dilution, la solution de lavage contient une solution basique pH ≈ 12.

### Utilisation

Pour le lavage des capillaires avant séparation électrophorétique de l'HbA<sub>1c</sub>.

**IMPORTANT** : Avant de remplir le flacon de solution de lavage, il est recommandé de rincer abondamment à l'eau distillée ou déminéralisée le connecteur et le tuyau afin d'éviter l'accumulation de sels.

### Conservation, stabilité et signes de détérioration

Les solutions de lavage concentrée et diluée doivent être conservées à température ambiante ou au réfrigérateur en flacons fermés pour éviter l'évaporation. La solution concentrée est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le kit ou sur l'étiquette du flacon de solution de lavage. La solution diluée est stable pendant 3 mois.

Éliminer la solution de lavage diluée s'il y a un changement d'aspect ou apparition d'un trouble dû à une contamination microbienne.

## 4. CUPULES RÉACTIF

### Utilisation

Cupules à usage unique pour la dilution et la migration des échantillons de sang par l'automate. À placer sur le chargeur de MINICAP FLEX-PIERCING. Une cupule est destinée à l'analyse de 2 échantillons.

**ATTENTION** : Manipuler avec précaution les cupules réactif contenant des échantillons biologiques.

## 5. FILTRES

### Utilisation

Filtres à usage unique pour la filtration du tampon, de la solution de lavage reconstituée et de l'eau distillée ou déminéralisée (utilisée pour le rinçage des capillaires).

**IMPORTANT** : Remplacer systématiquement les filtres à chaque renouvellement de kit.

Visser un filtre sur chaque embout de tuyau plongeant dans les flacons de tampon, de solution de lavage et d'eau distillée ou déminéralisée. Lors de la mise en place des filtres sur l'appareil, rincer les connecteurs et les tuyaux à l'eau distillée ou déminéralisée.

### Conservation

Avant utilisation, les filtres doivent être conservés dans leur emballage hermétiquement clos dans un endroit sec et à température ambiante ou au réfrigérateur.

## 6. BOÎTES POUR CUPULES USAGÉES

### Utilisation

Boîtes destinées à la récupération automatique des cupules réactif usagées sur MINICAP FLEX-PIERCING. À positionner sur MINICAP FLEX-PIERCING à l'emplacement prévu à cet effet.

**ATTENTION : Manipuler avec précaution les boîtes contenant les cupules réactif usagées contenant des échantillons biologiques.**

## 7. ÉTIQUETTES CODE-BARRES SOLUTION HÉMOLYSANTE

### Utilisation

Étiquettes destinées à identifier le tube de solution hémolysante (Hb A1c HEMOLYSING SOLUTION).

## RÉACTIFS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

**ATTENTION : Voir les fiches de données de sécurité.**

### 1. CALIBRATEURS Hb A1c CAPILLAIRE

#### Composition

Les Calibrateurs Hb A1c CAPILLAIRE (SEBIA, référence N° 4755) sont obtenus à partir de pools de sangs humains. Un procédé de stabilisation permet de préserver les fractions de l'hémoglobine et de conserver les calibrateurs sous forme lyophilisée.

Le Calibrateur 1 Hb A1c CAPILLAIRE présente une valeur normale d'HbA<sub>1c</sub>, le Calibrateur 2 Hb A1c CAPILLAIRE présente une valeur élevée d'HbA<sub>1c</sub>.

#### Application

Les Calibrateurs 1 et 2 Hb A1c CAPILLAIRE sont destinés à la calibration et au contrôle de migration de la méthode de quantification de l'hémoglobine glyquée humaine A<sub>1c</sub> par la technique électrophorétique MINICAP Hb A1c réalisée sur l'automate pour électrophorèse capillaire MINICAP FLEX-PIERCING, afin d'obtenir des résultats conformes au DCCT et établis selon le système de référence IFCC.

Analyser les calibrateurs selon les recommandations suivantes :

• **Réaliser 3 séries d'analyses successives des 2 calibrateurs :**

- lors de la première utilisation du programme d'analyses "Hb A1c" sur l'automate MINICAP FLEX-PIERCING ;
- après chaque changement de capillaire ;
- après chaque changement de lot de calibrateurs.

• **Réaliser une série d'analyses des 2 calibrateurs, puis d'un des 2 contrôles, avant l'analyse des échantillons :**

- après chaque changement de lot de tampon d'analyse ;
- après intervention du service technique ;
- en cas d'analyse des sangs de contrôle donnant une valeur de l'HbA<sub>1c</sub> hors des valeurs limites attendues (et après confirmation de cet écart après une seconde analyse des sangs de contrôle) ;
- au minimum tous les 2 mois.

**NOTE : Le changement de lot de solution hémolysante ne nécessite pas de calibration de l'automate.**

### Utilisation

#### IMPORTANT :

- Pour une utilisation optimale de chaque Calibrateur Hb A1c CAPILLAIRE sur MINICAP FLEX-PIERCING, il est indispensable d'utiliser un tube spécifique prévu à cet effet et son bouchon correspondant (voir "ÉQUIPEMENT ET ACCESSOIRES NÉCESSAIRES", Tubes et bouchons pour Contrôles) et d'identifier ce tube à l'aide d'une étiquette code-barres du calibrateur analysé.
- Les 2 calibrateurs doivent impérativement être analysés pour que la calibration soit effective : l'ordre d'analyse est indifférent, mais ils doivent être analysés dans la même journée de travail.

- Reconstituer chaque flacon lyophilisé de Calibrateur 1 et 2 Hb A1c CAPILLAIRE avec le volume d'eau distillée ou déminéralisée et selon le protocole indiqués dans la notice d'utilisation des Calibrateurs Hb A1c CAPILLAIRE. Incliner le flacon et l'agiter doucement afin de dissoudre la totalité du lyophilisat sans que le liquide ne touche le bouchon. Laisser reposer 30 minutes à 2 – 8 °C et agiter doucement (éviter la formation de mousse).

**NOTE : La précision du volume de reconstitution à respecter est de  $\pm 1,0$  %.**

- Déposer chaque calibrateur reconstitué dans un tube pour contrôle prévu à cet effet.
- Fermer le tube avec son bouchon.
- Identifier le tube avec l'étiquette code-barres spécifique du calibrateur.
- L'analyse de chaque calibrateur doit être réalisée selon le même protocole décrit ci-dessous.
- Pour chaque calibrateur, placer le tube (portant l'étiquette code-barres de ce calibrateur) sur un carrousel de MINICAP FLEX-PIERCING en position 28 prévue à cet effet (position "Control" avec bague de centrage).
- Mettre 5 mL de solution hémolysante MINICAP Hb A1c dans un tube à hémolyse (portant l'étiquette code-barres de la solution hémolysante) sans prélever de bulle d'air et placer ce tube en position 27 sur le carrousel (position "Diluent / Solution" sans bague de centrage) (en cas d'absence de tube ou de solution hémolysante, un message apparaît).

**IMPORTANT : Vérifier l'absence de mousse dans le tube de solution hémolysante avant de le placer sur le carrousel.**

- **Ne pas placer de tubes d'échantillons en positions 1 à 26 du carrousel.**
- Introduire le carrousel dans l'instrument MINICAP FLEX-PIERCING.
- Fermer les portes de MINICAP FLEX-PIERCING, l'analyse démarre automatiquement.
- Saisir dans la fenêtre apparaissant à l'écran, les caractéristiques du calibrateur analysé, indiquées dans la notice d'utilisation des Calibrateurs Hb A1c CAPILLAIRE (concentration en HbA<sub>1c</sub> en mmol/mol, numéro de lot et date d'expiration), sélectionner le nombre d'analyses du calibrateur à effectuer, selon les cas décrits précédemment, et valider.

**NOTE : La concentration en HbA<sub>1c</sub> est exprimée en unité IFCC (mmol/mol).**

- Les résultats obtenus sont alors automatiquement pris en compte par le logiciel pour le traitement des données.
- Retirer le tube de calibrateur en position 28 dès l'apparition de la fenêtre indiquant de retirer le tube.
- Dès que l'analyse du premier calibrateur est terminée, procéder à l'analyse du deuxième calibrateur selon le même protocole.

**ATTENTION : Après avoir fermé les portes de l'instrument, démarrer l'analyse du deuxième calibrateur à l'aide du bouton "Forcer le passage du contrôle en position 28".**

**IMPORTANT :** Pour une utilisation optimale de chaque Calibrateur Hb A1c CAPILLAIRE, il est indispensable d'utiliser une étiquette code-barres destinée à identifier le tube pour contrôle contenant le calibrateur (fermer ce tube avec son bouchon spécifique lors de son utilisation). Le logiciel affiche la valeur de l'HbA<sub>1c</sub> des 2 calibrateurs saisie par l'opérateur.

## Conservation, stabilité et signes de détérioration

Voir la notice d'utilisation des Calibrateurs Hb A1c CAPILLAIRE.

**ATTENTION :** Aucun test ne pouvant prouver l'absence des virus VIH, virus de l'hépatite B, virus de l'hépatite C ou tout autre agent infectieux, les Calibrateurs Hb A1c CAPILLAIRE doivent être manipulés avec les précautions habituelles pour éviter toute contamination.

Ces sangs, testés à l'aide de techniques agréées par une autorité compétente (FDA, ANSM...), sont négatifs :

- en antigène de surface de l'hépatite B,
- en anticorps anti-VHC,
- en anticorps anti-VIH 1 et anti-VIH 2.

## 2. CONTRÔLES Hb A1c CAPILLAIRE

### Composition

Les Contrôles Hb A1c CAPILLAIRE (SEBIA, référence N° 4774) sont obtenus à partir de pools de sangs humains. Un procédé de stabilisation permet de préserver les fractions de l'hémoglobine et de conserver les contrôles sous forme lyophilisée.

Le Contrôle 1 Hb A1c CAPILLAIRE présente une valeur normale d'HbA<sub>1c</sub>, le Contrôle 2 Hb A1c CAPILLAIRE présente une valeur élevée d'HbA<sub>1c</sub>.

### Application

Les Contrôles 1 et 2 Hb A1c CAPILLAIRE sont destinés au contrôle de qualité de la méthode de quantification de l'hémoglobine glyquée humaine A<sub>1c</sub> par la technique électrophorétique MINICAP Hb A1c réalisée sur l'automate pour électrophorèse capillaire MINICAP FLEX-PIERCING.

Les valeurs trouvées doivent être comprises entre les valeurs spécifiques à chaque lot.

**IMPORTANT :** Pour une utilisation optimale de chaque Contrôle Hb A1c CAPILLAIRE sur MINICAP FLEX-PIERCING, il est indispensable d'utiliser un tube spécifique prévu à cet effet et son bouchon correspondant (voir "ÉQUIPEMENT ET ACCESSOIRES NÉCESSAIRES", Tubes et bouchons pour Contrôles) et d'identifier ce tube à l'aide de l'étiquette code-barres du contrôle analysé.

### Détermination des valeurs personnalisées des Contrôles Hb A1c CAPILLAIRE :

Chaque laboratoire doit établir les valeurs des Contrôles 1 et 2 Hb A1c CAPILLAIRE propres à chaque instrument MINICAP FLEX-PIERCING selon le protocole décrit dans la notice d'utilisation des Contrôles Hb A1c CAPILLAIRE.

**ATTENTION : La détermination des valeurs des contrôles doit être réalisée :**

- après la première calibration de l'automate MINICAP FLEX-PIERCING,
- après changement d'un ou de plusieurs capillaires,
- lors de chaque changement de lot de calibrateurs ou de contrôles.

Voir la notice d'utilisation des Contrôles Hb A1c CAPILLAIRE.

### Contrôle Qualité :

- Analyser un des deux contrôles sur l'ensemble des 2 capillaires selon les recommandations suivantes :
  - après activation des capillaires ;
  - après chaque calibration de l'instrument réalisée avec les Calibrateurs Hb A1c CAPILLAIRE ;
  - après un cycle de nettoyage des capillaires avec CAPICLEAN ;
  - avant de lancer une nouvelle série d'analyses ;
  - après l'analyse d'un carrousel complet, en alternant le Contrôle 1 et le Contrôle 2 Hb A1c CAPILLAIRE, dans le cas de grandes séries d'échantillons.

- Reconstituer chaque flacon lyophilisé de Contrôle 1 et 2 Hb A1c CAPILLAIRE avec le volume d'eau distillée ou déminéralisée indiqué dans la notice d'utilisation des Contrôles Hb A1c CAPILLAIRE. Laisser reposer 30 minutes et agiter doucement (éviter la formation de mousse).

**NOTE :** La précision du volume de reconstitution à respecter est de  $\pm 1,0$  %.

- Déposer chaque contrôle reconstitué dans un tube pour contrôle prévu à cet effet.
- Fermer le tube avec son bouchon.
- Identifier le tube avec l'étiquette code-barres spécifique du contrôle.
- L'analyse de chaque contrôle doit être réalisée selon le même protocole décrit ci-dessous.
- Pour chaque contrôle, placer le tube (identifié avec l'étiquette code-barres correspondante) sur un carrousel de MINICAP FLEX-PIERCING en position 28 prévue à cet effet (position "Control" avec bague de centrage).
- Mettre 5 mL de solution hémolytante MINICAP Hb A1c dans un tube à hémolyse (portant l'étiquette code-barres de la solution hémolytante) sans prélever de bulle d'air et placer ce tube en position 27 sur le carrousel (position "Diluent / Solution" sans bague de centrage) (en cas d'absence de tube ou de solution hémolytante, un message apparaît).

**IMPORTANT :** Vérifier l'absence de mousse dans le tube de solution hémolytante avant de le placer sur le carrousel.

- Introduire le carrousel dans l'instrument MINICAP FLEX-PIERCING.
- Fermer les portes de MINICAP FLEX-PIERCING, l'analyse démarre automatiquement.
- Sélectionner dans la fenêtre apparaissant à l'écran le nombre d'analyses du Contrôle Hb A1c CAPILLAIRE à effectuer et valider.

- Les résultats obtenus sont alors automatiquement pris en compte par le logiciel pour le traitement des données.
- Retirer le tube de contrôle en position 28 dès l'apparition de la fenêtre indiquant de retirer le tube.
- Procéder à l'analyse du deuxième contrôle selon le même protocole.

**ATTENTION : Après avoir fermé les portes de l'instrument, si l'analyse du deuxième contrôle est réalisée dans la même journée que celle du premier contrôle, démarrer cette analyse à l'aide du bouton "Forcer le passage du contrôle en position 28". Ne pas placer de tubes d'échantillons en positions 1 à 26 du carrousel.**

- Vérifier les valeurs de concentrations et de pourcentages d'HbA<sub>1c</sub> obtenues sur les analyses des contrôles par rapport aux valeurs personnalisées déterminées sur l'instrument. Elles doivent être comprises entre les limites spécifiques à chaque lot. Dans le cas contraire, refaire une calibration de l'instrument à l'aide des Calibrateurs Hb A1c CAPILLAIRE (voir § "CALIBRATEURS Hb A1c CAPILLAIRE").

*NOTE : La concentration en HbA<sub>1c</sub> affichée par le logiciel, est exprimée en mmol/mol, sans décimale conformément aux recommandations de l'IFCC. Cette décimale est toutefois prise en compte pour la caractérisation de l'échantillon (sang normal ou sang à HbA<sub>1c</sub> augmentée), les calculs de statistiques et les graphiques selon Levey-Jennings.*

**IMPORTANT :** Pour une utilisation optimale de chaque Contrôle Hb A1c CAPILLAIRE, il est indispensable d'utiliser une étiquette code-barres destinée à identifier le tube pour contrôle contenant le sang de contrôle analysé (fermer ce tube avec son bouchon spécifique lors de son utilisation).

## Conservation, stabilité et signes de détérioration

Voir la notice d'utilisation des Contrôles Hb A1c CAPILLAIRE.

**ATTENTION :** Aucun test ne pouvant prouver l'absence des virus VIH, virus de l'hépatite B, virus de l'hépatite C ou tout autre agent infectieux, les Contrôles Hb A1c CAPILLAIRE doivent être manipulés avec les précautions habituelles pour éviter toute contamination.

Ces sangs, testés à l'aide de techniques agréées par une autorité compétente (FDA, ANSM...), sont négatifs :

- en antigène de surface de l'hépatite B,
- en anticorps anti-VHC,
- en anticorps anti-VIH 1 et anti-VIH 2.

## 3. EAU DISTILLÉE OU DÉMINÉRALISÉE

### Utilisation

Pour le rinçage des capillaires de l'automate pour électrophorèse capillaire, MINICAP FLEX-PIERCING, SEBIA.

Il est recommandé d'utiliser de l'eau distillée ou déminéralisée filtrée (sur filtre de porosité  $\leq 0,45 \mu\text{m}$ ).

Afin d'éviter les contaminations microbiennes, renouveler l'eau chaque jour. En cas de conservation prolongée, ajouter 350  $\mu\text{L/L}$  de CLEAN PROTECT (SEBIA, référence N° 2059 : 1 flacon de 5 mL).

**IMPORTANT :** Avant de remplir le flacon de rinçage, il est recommandé de le rincer abondamment avec de l'eau déminéralisée ou distillée.

## 4. CAPICLEAN

### Présentation

Le flacon de solution enzymatique concentrée CAPICLEAN (SEBIA, référence N° 2058 : 1 flacon de 25 mL) contient : enzymes protéolytiques, surfactants et composants sans danger aux concentrations utilisées, nécessaires pour des performances optimales.

### Utilisation

Pour le nettoyage de l'aiguille de prélèvement de l'automate pour électrophorèse capillaire, MINICAP FLEX-PIERCING, SEBIA, au cours du cycle de nettoyage CAPICLEAN.

**IMPORTANT :** Réaliser un cycle de nettoyage avec CAPICLEAN au minimum une fois par semaine et au maximum une fois par jour, ou toutes les 500 analyses quand elles sont réalisées en moins d'une semaine.

Voir la notice d'utilisation de CAPICLEAN, SEBIA.

**ATTENTION : Ne pas utiliser de tube bouché.**

**IMPORTANT :** Pour une utilisation optimale de CAPICLEAN sur MINICAP FLEX-PIERCING, il est indispensable d'utiliser une étiquette code-barres destinée à identifier le tube à hémolyse servant de support au microtube contenant la solution CAPICLEAN diluée (couper le bouchon du microtube lors de son utilisation).

## Conservation, stabilité et signes de détérioration

CAPICLEAN doit être conservé au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C). Il est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette du flacon. NE PAS CONGELER.

Un précipité ou des particules agrégées en suspension (floculat) peuvent être observés dans le flacon de CAPICLEAN sans que cela n'affecte son utilisation.

Ne pas remettre en suspension ce précipité ou ces particules. Il est recommandé de ne prélever que le surnageant.

Pour une utilisation différée, placer le tube contenant la solution diluée au réfrigérateur. Il doit être utilisé dans la journée.

## 5. SOLUTION D'HYPOCHLORITE DE SODIUM (pour le nettoyage de l'aiguille de prélèvement)

### Préparation

Préparer une solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel) à 2 - 3 % de chlore à partir d'une dose concentrée de 250 mL à 9,6 % de chlore diluée à 1 litre (volume final) dans de l'eau froide distillée ou déminéralisée.

### Utilisation

Pour le nettoyage de l'aiguille de prélèvement de l'automate pour électrophorèse capillaire, MINICAP FLEX-PIERCING, SEBIA (entretien hebdomadaire afin d'éliminer toute protéine adsorbée sur l'aiguille).

Voir le manuel d'instructions de MINICAP FLEX-PIERCING, SEBIA.

**ATTENTION : Ne pas utiliser de tube bouché.**

- Déposer 500 µL de solution d'hypochlorite de sodium, préparée précédemment, dans un microtube.
- Couper le bouchon du microtube.
- Placer le microtube, positionné sur un tube à hémolyse neuf qui servira de support (identifié avec une étiquette code-barres spécifique de la solution d'hypochlorite de sodium), sur le carrousel de MINICAP FLEX-PIERCING.
- Placer une cupule réactif neuve sur le chargeur de MINICAP FLEX-PIERCING prévu à cet effet (en cas d'absence de cupule réactif, un message apparaît).
- Introduire le carrousel dans l'instrument MINICAP FLEX-PIERCING.
- Fermer les portes de MINICAP FLEX-PIERCING, le cycle de nettoyage démarre automatiquement.

**IMPORTANT :** Pour une utilisation optimale de la solution d'hypochlorite de sodium sur MINICAP FLEX-PIERCING, il est indispensable d'utiliser une étiquette code-barres destinée à identifier le tube à hémolyse servant de support au microtube contenant la solution (couper le bouchon du microtube lors de son utilisation).

### Conservation, stabilité et signes de détérioration

La solution d'hypochlorite de sodium diluée peut être conservée 3 mois à température ambiante dans un récipient en plastique fermé hermétiquement, à l'abri des rayonnements solaires et de toute source de chaleur ou d'ignition et à l'écart des acides et de l'ammoniaque.

## 6. SOLUTION DE LAVAGE CAPILLARYS / MINICAP

### Préparation

Chaque flacon de solution de lavage concentrée CAPILLARYS / MINICAP (SEBIA, référence N° 2052 : 2 flacons de 75 mL) doit être complété à 750 mL avec de l'eau distillée ou déminéralisée.

Après dilution, la solution de lavage contient une solution basique pH = 12.

Pour MINICAP FLEX-PIERCING, il est recommandé de prélever la solution de lavage par quantité de 25 mL et compléter à 250 mL avec de l'eau distillée ou déminéralisée.

### Utilisation

Pour le lavage des capillaires de MINICAP FLEX-PIERCING.

**IMPORTANT :** Avant de remplir le flacon de solution de lavage, il est recommandé de rincer abondamment à l'eau distillée ou déminéralisée le col du flacon, le connecteur et le tuyau afin d'éviter l'accumulation de sels.

### Conservation, stabilité et signes de détérioration

Les solutions de lavage concentrée et diluée doivent être conservées à température ambiante ou au réfrigérateur en flacons fermés pour éviter l'évaporation. La solution concentrée est stable jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le kit ou sur l'étiquette du flacon.

La solution diluée est stable pendant 3 mois.

Éliminer la solution de lavage diluée s'il y a un changement d'aspect ou apparition d'un trouble dû à une contamination microbienne.

### NOTES :

*Les tests réalisés lors de la validation des réactifs montrent que, pour les différentes solutions et avec l'utilisation d'un matériel adapté au volume à reconstituer, une variation du volume final de  $\pm 5\%$  n'affecte en rien la qualité de l'analyse.*

*L'eau distillée ou déminéralisée, utilisée pour la reconstitution des solutions, doit être exempte de colonies bactériennes et de moisissures (utiliser un filtre de porosité de 0,22 µm) et d'une résistivité supérieure à 10 Megohms x cm.*

## ÉQUIPEMENT ET ACCESSOIRES NÉCESSAIRES

1. Instrument d'électrophorèse capillaire MINICAP FLEX-PIERCING SEBIA, référence N° 1232.
2. Kit de mise à jour HbA1c pour MINICAP FLEX-PIERCING SEBIA, référence N° 1238.
3. Carrousel fourni avec l'instrument MINICAP FLEX-PIERCING, équipé des bagues de centrage MINICAP FLEX-PIERCING (spécifiques à la technique MINICAP Hb A1c) pour tubes de diamètre de 13 mm.
4. Bagues de centrage MINICAP FLEX-PIERCING pour tubes de diamètre de 11 mm (par 27), SEBIA, référence N° 1612.
5. Bidons plastiques fournis avec l'instrument MINICAP FLEX-PIERCING : flacon pour le rinçage des capillaires (à remplir avec de l'eau déminéralisée ou distillée) et flacon de vidange.
6. Tubes de prélèvement de 13 mm de diamètre avec bouchons correspondants (hauteur maximale du tube avec bouchon : 100 mm, diamètre maximal du bouchon : 17 mm) : par exemple, tubes de 13 x 75 mm, BD Vacutainer, Terumo Venosafe 5 mL, Greiner Bio-one Vacuette 1, 2, 3 ou 4 mL ou Sarstedt S-Monovette 4 mL, ou tubes de prélèvement de 11 mm de diamètre avec bouchons correspondants (hauteur maximale du tube avec bouchon : 100 mm, diamètre maximal du bouchon : 17 mm) : par exemple, tubes de 11 x 66 mm, Sarstedt S-Monovette 2,7 mL ou Kabe Labortechnik Primavette S 2,6 mL, ou tous tubes de prélèvement de dimensions équivalentes homologués pour les tests de biologie clinique.
7. Tubes et bouchons pour Contrôles, SEBIA, référence N° 9205 : 500 tubes coniques et bouchons pour l'analyse des calibrateurs, des sangs de contrôle et des échantillons dont le volume est inférieur à 1 mL avec l'instrument MINICAP FLEX-PIERCING.
8. Tubes à hémolyse (diamètre de 8 à 16 mm et hauteur de 50 à 100 mm).
9. Étiquettes codes-barres "LOW VOLUME AUTOMATIQUE" SEBIA (par 20), référence N° 9208, destinées à identifier les échantillons de volume inférieur à 1 mL pour une analyse en "dilution automatique".
10. Étiquettes codes-barres "LOW VOLUME MANUEL" SEBIA (par 20), référence N° 9209, destinées à identifier les échantillons de volume inférieur à 1 mL pour une analyse en "dilution manuelle".
11. Cupules réactif MINICAP SEBIA (par 250), référence N° 2280.
12. Couvercles pour boîtes cupules réactifs MINICAP usagées (par 12), SEBIA, référence N° 2286 : couvercles destinés à fermer les boîtes pour cupules usagées.

## ÉCHANTILLONS À ANALYSER

### Prélèvement et conservation des échantillons

L'analyse se fait sur échantillons de sang total frais prélevés sur anticoagulant contenant de l'EDTA $K_2$  ou EDTA $K_3$ . Les sangs doivent être prélevés selon la procédure utilisée pour tout test de laboratoire d'analyses cliniques.

Les sangs peuvent être conservés au maximum 7 jours au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C) ou au maximum 18 heures à température ambiante (entre 15 et 30 °C).

Pour des conservations prolongées, congeler rapidement les échantillons à - 80 °C sans préparation préalable (au maximum dans les 8 heures après le prélèvement).

Les sangs congelés à - 80 °C sont stables au maximum 3 mois.

**IMPORTANT** : Pour une conservation optimale des échantillons, ne pas les conserver à - 20 °C mais à - 80 °C.

### Préparation des échantillons

- Utiliser directement les échantillons de sang total.
- Vérifier que tous les tubes contiennent au minimum 1 mL de sang et qu'ils sont parfaitement bouchés.
- **Agiter au vortex pendant 5 secondes les sangs conservés à 2 - 8 °C pendant 1 semaine ou conservés à - 80 °C.**

**ATTENTION** : Les tubes doivent être bouchés avec leurs bouchons correspondants adaptés à la technique MINICAP Hb A1c sur MINICAP FLEX-PIERCING (voir ÉQUIPEMENT ET ACCESSOIRES NÉCESSAIRES).

#### Cas particuliers :

**IMPORTANT** : Les échantillons dont la préparation est décrite ci-dessous doivent être identifiés par une étiquette code-barres "LOW VOLUME AUTO" ou "LOW VOLUME MANUAL", ces étiquettes permettent à l'instrument d'appliquer respectivement le mode de dilution automatique ou manuelle, selon la méthode de préparation de l'échantillon. Ces échantillons doivent être placés sur le carrousel au début d'une série d'analyses en prenant bien soin de laisser le code-barres de chaque tube en face de sa fenêtre de lecture. En l'absence de code-barres, l'analyse peut être affectée.

#### Analyse d'échantillons dont le volume est inférieur à 1 mL :

- Agiter au vortex le tube de sang total pendant 5 secondes et préparer l'échantillon, en fonction de son volume, selon un des protocoles suivants :

##### 1. Volume d'échantillon compris entre 200 $\mu$ L et 1 mL :

- Déposer au minimum 200  $\mu$ L de sang total à analyser dans un tube conique pour contrôle (identifié avec une étiquette code-barres "LOW VOLUME AUTO") et boucher le tube.
- Placer le tube sur un carrousel de MINICAP FLEX-PIERCING au début d'une série d'analyses et introduire le carrousel dans l'instrument afin de réaliser l'analyse dans les plus brefs délais.
- Fermer les portes de MINICAP FLEX-PIERCING, l'analyse démarre automatiquement.

ou

##### 2. Volume d'échantillon inférieur à 200 $\mu$ L :

- Déposer 50  $\mu$ L de sang total à analyser dans un tube conique pour contrôle (identifié avec une étiquette code-barres "LOW VOLUME MANUAL") et 250  $\mu$ L de solution hémolyzante MINICAP Hb A1c et boucher le tube.
- Agiter au vortex pendant 5 secondes.
- Placer le tube sur un carrousel de MINICAP FLEX-PIERCING au début d'une série d'analyses et introduire le carrousel dans l'instrument afin de réaliser l'analyse dans les plus brefs délais.
- Fermer les portes de MINICAP FLEX-PIERCING, l'analyse démarre automatiquement.

Les résultats obtenus sont alors automatiquement pris en compte par le logiciel pour le traitement des données.

**NOTES** : Le volume minimal d'échantillon à analyser dans un tube conique est de 200  $\mu$ L. En l'absence de code-barres sur le tube conique, l'échantillon n'est plus identifié et le type de dilution (automatique ou manuelle selon la méthode de préparation de l'échantillon) ne peut pas être appliqué.

### Échantillons à éviter

- Éviter d'utiliser des échantillons présentant un début de coagulation.
- Ne pas utiliser des échantillons de sangs anciens ou conservés dans de mauvaises conditions, l'hémolyse automatique des échantillons risque d'être perturbée par la présence d'agglomérats visqueux entre les globules rouges ; le profil électrophorétique peut également être affecté par des produits de dégradation des hémoglobines (ou artéfacts) : en effet, une fraction supplémentaire migre, en particulier, au niveau de l'Hb A2 et / ou en position anodique par rapport à l'Hb A0 (dans la zone de migration "autres Hb A") dans ce type d'échantillons.
- Dans ces 2 cas, la présence d'agglomérats de globules rouges peut empêcher le prélèvement de l'échantillon.
- Ne pas utiliser directement de tube contenant moins de 1 mL d'échantillon de sang à analyser, l'analyse peut être affectée (voir cas particuliers).

## TECHNIQUE

MINICAP FLEX-PIERCING est un instrument multiparamétrique automatique qui assure l'analyse des hémoglobines sur 2 capillaires en parallèle selon les étapes suivantes :

- lecture des codes-barres du carrousel et des tubes primaires (jusqu'à 26) ;
- agitation des échantillons avant analyse ;
- hémolyse et dilution des échantillons à partir des tubes primaires dans les cupules réactif ;
- lavage des capillaires ;
- injection des échantillons hémolysés ;
- séparation et détection directe des hémoglobines dans les capillaires.

Les étapes manuelles sont les suivantes :

- mise en place des tubes primaires (avec bouchons) sur le carrousel en positions 1 à 26 ;
- mise en place du tube de solution hémolysante sans bouchon, en position 27 sur le carrousel ;
- mise en place des Calibrateurs et des Contrôles Hb A1c Capillaire en position 28 sur le carrousel ;
- introduction du carrousel dans l'instrument MINICAP FLEX-PIERCING ;
- récupération des tubes après analyse ;
- récupération et fermeture des boîtes pour cupules usagées.

LIRE ATTENTIVEMENT LE MANUEL D'INSTRUCTIONS DE MINICAP FLEX-PIERCING.

## I. PRÉPARATION DE L'ANALYSE ÉLECTROPHORÉTIQUE

1. Mettre MINICAP FLEX-PIERCING et l'ordinateur de contrôle sous tension.
  2. Pour le démarrage, placer au moins une cupule réactif neuve sur le chargeur de MINICAP FLEX-PIERCING prévu à cet effet (en cas d'absence de cupule réactif, un message apparaît).
  3. Démarrer le logiciel, l'automate est alors automatiquement initialisé.
  4. Utiliser le kit MINICAP Hb A1c avec le programme d'analyses "Hb A1c". Pour sélectionner le programme d'analyses "Hb A1c" et mettre en place le flacon de tampon MINICAP Hb A1c en position "B2" sur l'appareil, lire attentivement le manuel d'instructions de MINICAP FLEX-PIERCING et suivre les instructions apparaissant à l'écran.
  5. Placer les cupules réactif neuves sur le chargeur de MINICAP FLEX-PIERCING prévu à cet effet (en cas d'absence de cupule réactif, un message apparaît).
  6. **Placer une boîte pour cupules usagées dans MINICAP FLEX-PIERCING à l'emplacement prévu à cet effet.**
  7. Vérifier le niveau de remplissage des différents flacons de réactifs, compléter les volumes, si nécessaire, et vider le flacon de vidange. Dans la fenêtre "Vérifier le niveau des bidons", réactualiser le logiciel de contrôle au moyen des curseurs.
  8. Le carrousel possède 28 emplacements pour tubes :
    - Placer jusqu'à 26 tubes primaires de sang total avec bouchons sur le carrousel équipé des bagues de centrages spécifiques (positions 1 à 26), en prenant bien soin de laisser le code-barres de chaque tube en face de sa fenêtre de lecture.
    - Mettre la solution hémolysante MINICAP Hb A1c dans un tube à hémolyse sans bouchon, portant l'étiquette code-barres de la solution hémolysante, sans prélever de bulle d'air, à raison de 2 mL pour l'analyse d'1 ou de 2 échantillons, ou de 5 mL pour l'analyse de 12 échantillons. Placer ce tube en position 27, sans bague de centrage, sur le carrousel de l'automate (position "Diluent / Solution").
- NOTE : 5 mL de solution hémolysante déposés dans un tube de 13 x 75 mm permettent d'effectuer 12 analyses ; 10 mL de solution hémolysante dans un tube de 16 x 100 mm permettent d'effectuer 24 analyses.*
- IMPORTANT :** Vérifier l'absence de mousse dans le tube de solution hémolysante avant de le placer sur le carrousel.
- Placer un des 2 Contrôles Hb A1c Capillaire en position 28 sur le carrousel (position "Control") et sélectionner le nombre d'analyses à effectuer selon les indications du paragraphe précédent "Contrôles Hb A1c Capillaire", partie "Contrôle qualité".
- IMPORTANT :** En cas d'absence de tubes en positions No. 1 (échantillon), 27 (solution hémolysante) et 28 (sang de contrôle ou calibrateur), l'analyse ne peut pas démarrer et un message apparaît.
- NOTE : Lors de l'utilisation d'un sang de contrôle ou d'un calibrateur, il est indispensable d'utiliser l'étiquette code-barres spécifique prévue à cet effet.*
9. Interdire le carrousel dans l'instrument MINICAP FLEX-PIERCING.
  10. Fermer les portes de MINICAP FLEX-PIERCING, l'analyse démarre automatiquement.
  11. Après analyse, retirer le carrousel afin d'enlever les tubes déjà analysés.
  12. Si nécessaire, retirer avec précaution la boîte contenant les cupules réactif usagées, la fermer hermétiquement à l'aide du couvercle destiné à cet effet et la jeter.

**ATTENTION : Manipuler avec précaution les boîtes contenant les cupules réactif usagées contenant des échantillons biologiques.**

## DILUTION - MIGRATION - DESCRIPTION DES SÉQUENCES AUTOMATIQUES

1. Lecture des codes-barres du carrousel et des tubes primaires d'échantillon.
2. Agitation des tubes.
3. Dilution des sangs dans la solution hémolysante, avec rinçage de l'aiguille de prélèvement entre chaque dilution.
4. Lavage des capillaires.
5. Injection des échantillons dilués dans les capillaires.
6. Migration à voltage constant en température régulée par effet Peltier, pendant environ 9 minutes.
7. Lecture à 415 nm et apparition simultanée du profil des hémoglobines sur l'écran de l'ordinateur.

*NOTE : Ces étapes sont effectuées les uns après les autres pour les 2 premiers tubes analysés : les profils correspondant aux tubes analysés sont obtenus après 20 minutes environ. Pour les tubes suivants, les phases 1, 2 et 3 (lecture des codes-barres, agitation et hémolyse des sangs) se font en temps masqué, pendant l'analyse des 2 tubes précédents.*

## II. TRAITEMENT DES DONNÉES

Dès la fin de l'analyse, la quantification de la fraction HbA<sub>1c</sub> est automatiquement effectuée.

Les valeurs d'HbA<sub>1c</sub> sont standardisées et sont exprimées, conformément aux recommandations de l'IFCC, en % (avec une décimale) et en mmol/mol (sans décimale) (Ragnar Hanas *et al*, 2010).

*NOTE : La caractérisation de l'échantillon (sang normal ou sang à HbA<sub>1c</sub> augmentée) étant basée sur la valeur réelle de la concentration en HbA<sub>1c</sub> en mmol/mol (nombre entier calculé par le logiciel de traitement des données), une discordance peut apparaître pour des valeurs proches du seuil.*

L'identification des sangs normaux et des sangs avec HbA<sub>1c</sub> augmentée est automatiquement réalisée et les profils peuvent être distingués dans la mosaïque des courbes comme normaux en bleu, ou avec HbA<sub>1c</sub> augmentée en orange :

- Les échantillons normaux, dont la concentration en HbA<sub>1c</sub> dite "normale" est inférieure ou égale à 42 mmol/mol (ou 6,0 %) sont présentés en bleu.
- Les échantillons à HbA<sub>1c</sub> augmentée, dont la concentration en HbA<sub>1c</sub> est supérieure à 42 mmol/mol (6,0 %) sont présentés en orange.

Les profils électrophorétiques présentant une anomalie (avec présence d'un pic supplémentaire ou absence d'un pic parmi les fractions normales HbA<sub>1c</sub>, Other Hb A, Hb A0 et Hb A2) sont présentés en violet avec les mentions "Profil atypique" et "Hb A1c (\*)".

Les profils sont automatiquement recentrés par rapport au pic d'Hb A0 afin de faciliter leur interprétation.

Le tableau suivant présente les symboles et les messages d'alerte affichés ainsi que les procédures à suivre selon l'échantillon analysé :

| <div> <div>  </div> <div>  </div> <div>  </div> </div> <div> <b>Symbole d'alerte</b><br/><br/> <b>Échantillon analysé</b> </div> | Valeur d'HbA <sub>1c</sub> hors spécifications pour les calibrateurs                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Absence de détection des pics d'Hb A0 et / ou HbA <sub>1c</sub>                                                                                                                                                                               | Densité optique du pic d'Hb A0 insuffisante                                                                                                                                                      | Profil atypique (présence d'un pic supplémentaire ou absence d'un pic normal)         | Valeur d'HbA <sub>1c</sub> hors des valeurs attendues pour les contrôles analysés en mode Contrôle Qualité (QC)                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Calibrateurs identifiés par étiquettes code-barres                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Message d'alerte : "analyse du calibrateur non conforme" : analyser un contrôle en position 28 ou répéter la calibration [en cas d'absence de calibration valide sur un (ou 2) capillaire(s), ce(s) capillaire(s) est (sont) désactivé(s), l'analyse de l'HbA <sub>1c</sub> des échantillons et des contrôles sur le(s) capillaire(s) concerné(s) n'est pas réalisée]. |                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                  |                                                                                       | /                                                                                                                                                                |
| Contrôles identifiés par étiquettes code-barres                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Pas de valeur d'HbA <sub>1c</sub> affichée                                                                                                                                                                                                    | /                                                                                                                                                                                                | /                                                                                     | En mode Contrôle Qualité : identification "+" ou "-" selon la valeur d'HbA <sub>1c</sub> obtenue par rapport aux valeurs personnalisées saisies par l'opérateur. |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Message d'alerte : "analyse du contrôle non conforme":<br>1. répéter l'analyse en position 28 à partir du même flacon,<br>2. répéter l'analyse sur un nouveau flacon,<br>3. contacter le Service Technique SEBIA en cas de problème confirmé. |                                                                                                                                                                                                  |                                                                                       | En mode Contrôle Qualité, message d'alerte : "analyse du contrôle non conforme", réaliser une nouvelle calibration.                                              |
| Sang de patient                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Pas de valeur d'HbA <sub>1c</sub> affichée (si Hb F > 15 %, épaulement de l'HbA <sub>1c</sub> ou de Hb A0)                                                                                                                                                                                                                                                             | Suspecter la présence d'un variant ou un défaut de recentrage des profils électrophorétiques, répéter l'analyse pour confirmation.                                                                                                            | Message d'alerte : "DO trop faible" (< 0,07) pour échantillon quelconque non atypique, répéter l'analyse : si le résultat est confirmé, la valeur d'HbA <sub>1c</sub> peut être prise en compte. | "profil atypique" et "HbA <sub>1c</sub> (*)" : suspecter la présence d'un variant Hb. | /                                                                                                                                                                |

En cas d'échantillon présentant un pourcentage d'Hb A2 supérieur à 3,0 %, un point d'exclamation apparaît associé au nom de la fraction ("Hb A2 !"). Un cas de bêta-thalassémie, susceptible d'altérer la synthèse de l'HbA<sub>1c</sub> peut alors être suspecté (cas d'interférence physio-pathologique). Il est recommandé d'analyser l'échantillon dans la technique MINICAP HEMOGLOBIN(E) afin de vérifier le pourcentage d'Hb A2 et d'étudier le dossier clinique du patient. Le dosage de l'HbA<sub>1c</sub> peut cependant être utilisé pour le suivi du même patient.

LIRE ATTENTIVEMENT LE MANUEL D'INSTRUCTIONS DE MINICAP FLEX-PIERCING.

### III. FIN DE SÉQUENCE D'ANALYSE

Une procédure d'extinction doit être lancée par l'opérateur en fin de session de travail afin de conserver les capillaires dans des conditions optimales.

**IMPORTANT** : Placer une cupule réactif neuve sur le chargeur de MINICAP FLEX-PIERCING prévu à cet effet (en cas d'absence de cupule réactif, un message apparaît).

### IV. REMPLISSAGE DES FLACONS DE RÉACTIFS

L'automate MINICAP FLEX-PIERCING permet une gestion automatique des réactifs.

**IMPORTANT** : Il est nécessaire de suivre la procédure prévue pour le changement des flacons et de respecter le code couleur flacon – raccord rapide lors de chaque remplacement de flacon.

L'apparition de la fenêtre de gestion des réactifs indique qu'il est nécessaire de changer un ou plusieurs réactifs :

- mise en place d'un nouveau flacon de tampon d'analyse et / ou,
- remplissage du flacon de lavage avec la solution de lavage reconstituée et / ou,
- remplissage du flacon de rinçage par de l'eau déminéralisée ou distillée filtrée et / ou,
- vidange du flacon de vidange.

**ATTENTION** : Ne pas utiliser d'eau déminéralisée du commerce, eau pour fer à repasser par exemple (risque de détérioration importante des capillaires). Utiliser exclusivement de l'eau de qualité ultrapure, type eau pour préparation injectable.

**IMPORTANT** : Avant de remplir le flacon de rinçage, il est recommandé de le rincer abondamment avec de l'eau déminéralisée ou distillée.

LIRE ATTENTIVEMENT LE MANUEL D'INSTRUCTIONS DE MINICAP FLEX-PIERCING.

## CONTRÔLE QUALITÉ

Après activation des capillaires, après chaque calibration de l'instrument réalisée avec les Calibrateurs Hb A1c CAPILLAIRE, après un cycle de nettoyage des capillaires avec CAPICLEAN et avant de lancer une nouvelle série d'analyses, il est nécessaire d'effectuer une analyse avec les Contrôles Hb A1c 1 ou 2 CAPILLAIRE, SEBIA, référence N° 4774.

De plus, dans le cas de grandes séries d'échantillons, il est conseillé d'analyser un des deux contrôles après l'analyse d'un carrousel complet, en alternant le Contrôle 1 et le Contrôle 2 Hb A1c CAPILLAIRE.

**ATTENTION : Dans le cas où l'analyse des contrôles donne un résultat situé hors des valeurs personnalisées, les échantillons analysés sur le(s) capillaire(s) concerné(s) depuis le dernier contrôle valide doivent être à nouveau analysés.**

**IMPORTANT :** Pour une utilisation optimale des sangs de contrôle sur MINICAP FLEX-PIERCING, il est indispensable d'utiliser les tubes coniques spécifiques prévus à cet effet et leurs bouchons correspondants (voir "ÉQUIPEMENT ET ACCESSOIRES NÉCESSAIRES") et d'identifier chacun de ces tubes à l'aide d'une étiquette code-barres du sang de contrôle analysé.

## RÉSULTATS

### Valeurs

La détection directe sur le capillaire à 415 nm permet de définir les valeurs relatives (pourcentages) de chaque fraction, notamment la concentration calibrée de la fraction HbA<sub>1c</sub>.

Valeurs normales de l'hémoglobine A<sub>1c</sub> : ≤ 42 mmol/mol (6,0 %) (Geistanger *et al*, 2008).

Pour plus d'informations, se référer à : [http://www.ifcccha1c.net/IFCC\\_08.asp?type=N](http://www.ifcccha1c.net/IFCC_08.asp?type=N)

### Interprétation

Voir PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES.

### Interférences

**NOTE :** L'étude des interférents communément rencontrés dans l'analyse de l'HbA<sub>1c</sub> (triglycérides, bilirubine, acide ascorbique, urée, facteur rhumatoïde, glibenclamide, hémoglobine carbamylée, HbA<sub>1c</sub> labile et Hb F) a été réalisée à l'aide des recommandations EP7-A2 "Interference Testing in Clinical Chemistry" du Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - USA).

Les résultats sont présentés ci-dessous :

- Dans la technique MINICAP Hb A1c, la présence dans l'échantillon de sang de taux élevés d'interférents, testés aux concentrations indiquées dans le tableau suivant, n'interfère pas sur la quantification de l'HbA<sub>1c</sub> :

| Interférent        | Concentration       |
|--------------------|---------------------|
| Triglycérides      | 3,07 g/dL (35,1 mM) |
| Bilirubine         | 25,8 mg/dL (442 µM) |
| Acide ascorbique   | 60 mg/dL (3,41 mM)  |
| Urée               | 291 mg/dL (48,5 mM) |
| Facteur rhumatoïde | 2178 IU/mL          |
| Glibenclamide      | 3 mg/dL             |

- Dans la technique MINICAP Hb A1c, la présence dans l'échantillon de sang d'hémoglobine carbamylée (jusqu'à 8,7 %) et d'HbA<sub>1c</sub> labile (jusqu'à 14,8 %) n'interfère pas sur la quantification de l'HbA<sub>1c</sub>.
- La présence d'Hb F jusqu'à 15 %, dans l'échantillon de sang n'interfère pas sur la quantification de la fraction HbA<sub>1c</sub> ; aucun résultat ne sera rendu par le logiciel au-delà de 15 % d'Hb F.
- Analyse en présence de variants de l'hémoglobine :
  - Les formes glycosylées de variants communs de l'hémoglobine (Hb S, Hb C, Hb D ou Hb E par exemple) migrent conjointement avec la fraction Hb A0 ou les fractions Hb A1 mineures (fraction "other Hb A") sans modification du résultat de l'HbA<sub>1c</sub>.
  - Certains variants de l'hémoglobine peuvent apparaître sous forme d'un épaulement de la fraction Hb A0 pouvant ne pas être détecté par le logiciel. Seul un examen visuel du profil électrophorétique permet de détecter cet épaulement. Ne pas rendre de résultat de l'HbA<sub>1c</sub> dans ce cas. Une confrontation avec le bilan hématologique et une analyse complémentaire sont alors indispensables afin de vérifier la présence d'un variant.
  - De plus, parmi les variants de migration proche de l'Hb A0, voire confondus avec l'Hb A0, certains variants peuvent donner un pic supplémentaire ("X1c") distinct de l'HbA<sub>1c</sub>. Le profil électrophorétique sera présenté avec la mention "Profil atypique". Ne pas rendre de résultat de l'HbA<sub>1c</sub> dans ce cas.
  - Lors de l'analyse d'échantillons sans Hb A (de patients homozygotes ou avec variants hétérozygotes S/S ou S/C, par exemple), quand l'Hb F est présente, elle peut être confondue avec l'Hb A0 du fait de leurs positions de migration très proches. Aucun résultat ne sera rendu par le logiciel en raison de l'absence d'HbA<sub>1c</sub> dans ce type d'échantillon.

- Dans le cas de patients ayant présenté des hémorragies importantes récentes, le taux d'HbA<sub>1c</sub> peut être sous-évalué du fait d'une forte proportion dans le sang d'hématies nouvellement synthétisées.
- Une durée de vie anormale des hématies, comme dans le cas d'anémies hémolytiques ou l'ablation de la rate peuvent affecter le taux d'HbA<sub>1c</sub>. Toutefois, un tel dosage peut être utilisé pour le suivi du même patient.

### Limites

- Voir ÉCHANTILLONS À ANALYSER.
- Analyser uniquement des échantillons contenus dans les tubes de prélèvement recommandés dans le paragraphe "ÉQUIPEMENT ET ACCESSOIRES NÉCESSAIRES" ou tous tubes de dimensions équivalentes homologués pour les tests de biologie clinique. Contacter le Service Technique SEBIA pour toute information relative à ces dispositifs.
- Ne pas utiliser directement d'échantillon dont le volume est inférieur à 1 mL.
- Ne pas utiliser des échantillons de sangs anciens ou conservés dans de mauvaises conditions, la présence d'hémoglobines dégradées peut être observée sur le profil électrophorétique sous forme d'artéfacts plus ou moins nombreux après 7 jours de conservation. Une fraction supplémentaire migre, en particulier, au niveau de l'Hb A2 et / ou en position anodique par rapport à l'Hb A0 (dans la zone de migration "autres Hb A") dans ce type d'échantillons.
- Au-delà de 10 jours, la présence d'agglomérats visqueux dans les globules rouges est observée : il est indispensable de les éliminer avant d'effectuer l'analyse.
- Les échantillons de certains patients hétérozygotes A / C avec Hb F peuvent présenter une fraction Hb A0 parfois mal intégrée par le logiciel.
- Compte tenu des principes analytiques des techniques actuelles (principes de l'électrophorèse de zone, résolution), aucune garantie ne peut être donnée quant à la quantification de l'HbA<sub>1c</sub> en présence de tous les variants de l'hémoglobine.

### Assistance technique

Contacter le Service Technique SEBIA en cas de test défectueux.

Les fiches de données de sécurité des différents réactifs du kit ainsi que les informations relatives au nettoyage et à l'élimination des déchets, aux règles d'étiquetage et de sécurité appliquées par SEBIA, à l'emballage de transport pour les échantillons biologiques et à la décontamination des appareils sont disponibles sur le DVD "INSTRUCTIONS & SAFETY DATA SHEETS".

### PERFORMANCES

#### Reproductibilité

L'étude de la reproductibilité de la technique MINICAP Hb A1c a été réalisée à l'aide des recommandations EP5-A2 "Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurements Methods" du Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - USA).

Les moyennes, écart-types et coefficients de variations (CV %) (n = 120) des concentrations (en mmol/mol) et des pourcentages (%) de l'HbA<sub>1c</sub> de chaque échantillon ont été calculés à l'aide d'outils statistiques recommandés par le CLSI.

#### Reproductibilité inter-lots et inter-instruments

Six (6) échantillons de sang différents ont été analysés dans la technique MINICAP Hb A1c sur les 2 capillaires de 3 instruments MINICAP FLEX-PIERCING et avec 3 lots de kits MINICAP Hb A1c. Les échantillons de sang analysés comprenaient 2 échantillons avec HbA<sub>1c</sub> normale (No. 1 et 2), 1 échantillon avec HbA<sub>1c</sub> proche du seuil (No. 3) et 3 échantillons avec HbA<sub>1c</sub> augmentée (No. 4, 5 et 6). Dans cette étude, chaque sang a été analysé sur les 2 capillaires de chaque instrument, à raison de 60 séquences d'analyses sur une durée de 10 jours (à 2 instants différents de la journée). Lors de chaque séquence, l'analyse des échantillons a été dupliquée.

Les tableaux suivants présentent les gammes de CV (%) obtenus pour la répétabilité et la reproductibilité totale inter-lots et inter-instruments pour les concentrations en HbA<sub>1c</sub> en mmol/mol et les pourcentages.

|                  | Moyenne<br>(concentration<br>HbA <sub>1c</sub> – mmol/mol) | Répétabilité |            | Reproductibilité totale |                  |
|------------------|------------------------------------------------------------|--------------|------------|-------------------------|------------------|
|                  |                                                            | CV min (%)   | CV max (%) | CV min total (%)        | CV max total (%) |
| Sang No. 1       | 33                                                         | 0,9          | 3,5        | 0,9                     | 3,5              |
| Sang No. 2       | 36                                                         | 1,1          | 4,0        | 1,2                     | 4,0              |
| Sang No. 3       | 47                                                         | 1,2          | 2,6        | 1,3                     | 2,6              |
| Sang No. 4       | 63                                                         | 0,7          | 1,6        | 0,7                     | 2,2              |
| Sang No. 5       | 76                                                         | 0,0          | 1,4        | 0,0                     | 1,4              |
| Sang No. 6       | 110                                                        | 0,4          | 1,4        | 0,6                     | 2,2              |
| Gamme des CV (%) |                                                            | 0,0          | 4,0        | 0,0                     | 4,0              |

|                  | Moyenne<br>(% HbA <sub>1c</sub> ) | Répétabilité |            | Reproductibilité totale |                  |
|------------------|-----------------------------------|--------------|------------|-------------------------|------------------|
|                  |                                   | CV min (%)   | CV max (%) | CV min total (%)        | CV max total (%) |
| Sang No. 1       | 5,2                               | 0,9          | 2,0        | 0,9                     | 2,2              |
| Sang No. 2       | 5,4                               | 0,9          | 2,1        | 0,9                     | 2,1              |
| Sang No. 3       | 6,4                               | 0,5          | 1,9        | 0,8                     | 1,9              |
| Sang No. 4       | 7,9                               | 0,7          | 1,4        | 0,8                     | 1,6              |
| Sang No. 5       | 9,1                               | 0,0          | 1,1        | 0,0                     | 1,1              |
| Sang No. 6       | 12,3                              | 0,4          | 1,2        | 0,6                     | 1,8              |
| Gamme des CV (%) |                                   | 0,0          | 2,1        | 0,0                     | 2,2              |

## Linearité

L'étude de la linéarité de la technique MINICAP Hb A1c a été réalisée à l'aide des recommandations EP6-A "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A statistical Approach" du Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - USA).

Les concentrations (en mmol/mol) et pourcentages (%) de l'HbA<sub>1c</sub> ont été analysés à l'aide d'outils statistiques recommandés par le CLSI.

L'analyse d'un mélange en proportions variables de deux échantillons de sang différents (dont un échantillon normal contenant 29 mmol/mol d'HbA<sub>1c</sub>, soit 4,8 % d'HbA<sub>1c</sub>, et un échantillon à HbA<sub>1c</sub> augmentée contenant 127 mmol/mol, soit 13,8 % d'HbA<sub>1c</sub>) a montré que le pourcentage de la fraction HbA<sub>1c</sub> est parfaitement corrélé à la proportion des 2 sangs dans le mélange et que toute variation est détectée de manière linéaire dans la technique MINICAP Hb A1c. Pour chaque mélange, l'analyse avait été dupliquée.

La technique MINICAP Hb A1c est parfaitement linéaire pour l'HbA<sub>1c</sub> dans la gamme des concentrations étudiées jusqu'à un maximum de l'ordre de 127 mmol/mol (entre 4,8 et 13,8 % d'HbA<sub>1c</sub>).

De plus, les analyses d'un sang normal contenant 31 mmol/mol d'HbA<sub>1c</sub> (5,0 % d'HbA<sub>1c</sub>), d'un échantillon avec HbA<sub>1c</sub> proche du seuil contenant 46 mmol/mol d'HbA<sub>1c</sub> (6,3 % d'HbA<sub>1c</sub>) et d'un sang à HbA<sub>1c</sub> augmentée contenant 79 mmol/mol d'HbA<sub>1c</sub> (9,3 % d'HbA<sub>1c</sub>), dilués en série dans la solution hémolytante, ont montré que la technique MINICAP Hb A1c est parfaitement linéaire dans la gamme des concentrations étudiées entre 2,5 et 31,1 g/dL d'hémoglobine totale et que les concentrations et pourcentages de la fraction HbA<sub>1c</sub> sont indépendants de la concentration en hémoglobine totale de l'échantillon dans la gamme des concentrations étudiées.

## Exactitude – Corrélation interne

L'étude de corrélation interne de la technique MINICAP Hb A1c réalisée sur l'instrument MINICAP FLEX-PIERCING a été réalisée à l'aide des recommandations EP09-A2 "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples ; Approved Guideline – Second Edition (Interim Revision)" du Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - USA).

Les concentrations (en mmol/mol) et pourcentages (%) de l'HbA<sub>1c</sub> ont été analysés à l'aide d'outils statistiques recommandés par le CLSI.

*NOTE : Les échantillons de sang, utilisés dans l'étude de corrélation interne présentée ci-dessous, ont été fournis par 6 laboratoires situés en France, aux Pays-Bas et aux USA.*

*Tous les échantillons ont été analysés en parallèle dans les 2 techniques d'analyse et selon les mêmes recommandations.*

Cent cinq (105) échantillons de sang, dont 30 échantillons présentant un taux d'HbA<sub>1c</sub> normal et 75 échantillons présentant un taux d'HbA<sub>1c</sub> augmenté, ont été analysés en parallèle dans la technique MINICAP Hb A1c sur l'instrument MINICAP FLEX-PIERCING et dans une technique de quantification de l'hémoglobine A<sub>1c</sub> par électrophorèse capillaire disponible dans le commerce, conforme à la standardisation NGSP.

La corrélation entre ces deux techniques sur la concentration et le pourcentage d'HbA<sub>1c</sub> a été déterminée à l'aide d'outils statistiques de régression linéaire. Les résultats obtenus ont montré une parfaite corrélation entre les deux techniques pour la quantification de l'HbA<sub>1c</sub>.

Les paramètres de corrélation entre les 2 systèmes d'analyse (y = MINICAP Hb A1c) sont présentés dans le tableau ci-dessous, la sensibilité et la spécificité de la technique MINICAP Hb A1c par rapport à la technique de référence ont été calculées selon la méthode recommandée (Wending, 1986).

| HbA <sub>1c</sub>        | Coefficient de corrélation | Intersection avec l'axe y | Pente | Limites des valeurs MINICAP Hb A1c | Sensibilité (%) | Spécificité (%) |
|--------------------------|----------------------------|---------------------------|-------|------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Concentration (mmol/mol) | 0,998                      | 1,149                     | 0,987 | 28 - 131                           | 100,0           | 96,7            |
| Pourcentage (%)          | 0,998                      | 0,128                     | 0,987 | 4,7 – 14,2                         | 100,0           | 96,7            |

## INTENDED USE

The MINICAP Hb A1c kit is designed for separation and quantification of the HbA<sub>1c</sub> glycosylated fraction of hemoglobin in human blood, by capillary electrophoresis in alkaline buffer (pH 9.4) with the MINICAP FLEX-PIERCING instrument.

The MINICAP FLEX-PIERCING instrument is an automated analyzer which performs a complete hemoglobin profile for the quantitative analysis of HbA<sub>1c</sub> fraction. The hemoglobins, separated in silica capillaries, are directly detected by their absorbance at 415 nm.

The assay is performed on the hemolysate of whole blood samples collected in tubes containing K<sub>2</sub>EDTA or K<sub>3</sub>EDTA as anticoagulant. Quantitative determination of hemoglobin A<sub>1c</sub> is effective in monitoring middle-term blood glucose control in diabetic individuals.

The MINICAP Hb A1c procedure performed with the MINICAP FLEX-PIERCING instrument has been certified by the National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP).

For *In Vitro* Diagnostic Use.

## PRINCIPLE OF THE TEST

Hemoglobin glycation is a non-enzymatic reaction between the intra-erythrocyte glucose and the N-terminal amino-group of the hemoglobin  $\beta$  chains. This reaction takes place during the entire life of the red blood cells. The rate of glycosylated hemoglobin formation is related to the glycemia insofar as the intra-erythrocyte glucose concentration does not depend on insulin but only on the glycemia. It accumulates in red blood cells during the 120 days of their life.

The level of glycosylated hemoglobin corresponds to the "integration" of all the glycemic variations during the previous weeks. It can be used as an index of diabetes control. This quantification allows to evaluate the middle term efficiency of treatments.

Electrophoresis is a well established technique routinely used in clinical laboratories for measuring components from body fluids, including HbA<sub>1c</sub> glycosylated fraction. The MINICAP FLEX-PIERCING instrument has been developed to provide complete automation of this testing with fast separation and good resolution. In many aspects, the methodology can be considered as an intermediary type of technique between classical zone electrophoresis and liquid chromatography.

The MINICAP FLEX-PIERCING instrument uses the principle of capillary electrophoresis in free solution. With this technique, charged molecules are separated by their electrophoretic mobility in an alkaline buffer with a specific pH. Separation also occurs according to the electrolyte pH and electroosmotic flow.

The MINICAP FLEX-PIERCING instrument has silica capillaries functioning in parallel allowing 2 simultaneous analyses for HbA<sub>1c</sub> quantification from whole blood sample. A sample dilution with hemolysing solution is prepared and injected by aspiration at the anodic end of the capillary. A high voltage protein separation is then performed and direct detection of the hemoglobins is made at the cathodic end of the capillary at 415 nm, which is the absorbance wave length specific to hemoglobins. Before each run, the capillaries are washed with a wash solution and prepared for the next analysis with buffer.

Direct detection provides accurate relative quantification of individual hemoglobin A<sub>1c</sub> fraction.

In addition, the high resolution of MINICAP Hb A1c procedure allows the quantification of HbA<sub>1c</sub>, and particularly, even in the presence of labile HbA<sub>1c</sub>, carbamylated and acetylated hemoglobins, and major hemoglobin variants.

By using alkaline pH buffer, normal and abnormal (or variant) hemoglobins are detected in the following order, from cathode to anode : A2/C, E, S/D, F, A0, other Hb (including minor Hb A1) and then A<sub>1c</sub>.

## REAGENTS AND MATERIALS SUPPLIED IN THE MINICAP Hb A1c KIT

**WARNING : See the safety data sheets.**

| ITEMS                               | PN 2215              |
|-------------------------------------|----------------------|
| Buffer (ready to use)               | 2 vials, 250 mL each |
| Hemolysing solution (ready to use)  | 1 vial, 225 mL       |
| Wash solution (stock solution)      | 1 vial, 25 mL        |
| Reagent cups                        | 1 pack of 125        |
| Filters                             | 3 filters            |
| Bins for used cups                  | 4 bins               |
| Hemolysing solution bar code labels | 5 sheets of 4 labels |

During transportation, the kit can be kept without refrigeration (15 to 30 °C) for 15 days without any adverse effects on performance.

### FOR OPTIMAL RESULTS

All reagents from the same kit must be always used together and according to the package insert instructions.

PLEASE READ THE PACKAGE INSERT CAREFULLY.

**WARNING : Do not use marketed deionized water, such as water for ironing for example (risk of important capillaries damage). Use only water with ultrapure quality, such as injection grade water.**

## 1. BUFFER

### Preparation

The buffer is ready to use. It contains : buffer solution pH  $9.4 \pm 0.5$  ; additives, nonhazardous at concentrations used, necessary for optimum performance.

### Use

Buffer for analysis of HbA<sub>1c</sub> with capillary electrophoresis.

### Storage, stability and signs of deterioration

Store the buffer refrigerated (2 to 8 °C). It is stable until the expiration date indicated on the kit package or buffer vial labels. Avoid storage at room temperature for a long time or close to a window or to a heat source.

DO NOT FREEZE.

**IMPORTANT** : When stored at 2 – 8 °C and prior to use, it is necessary for the buffer to reach room temperature ; when it is full, let the buffer vial at room temperature for at least 3 hours prior to use. If this precaution is not respected, the performances of the procedure may be affected.

**WARNING** : *Do not pre-heat the buffer in hot water.*

**After each use, the buffer must imperatively be stored refrigerated (between 2 and 8 °C) without any delay**, it is then stable until the expiration date indicated on the buffer vial label.

If the buffer vial is planned to be used within 20 days, it may be stored at room temperature.

Once the buffer vial has been opened and positioned on the MINICAP FLEX-PIERCING instrument, it is stable for a maximum of **20 days** (accumulated) at room temperature (15 to 30 °C).

**IMPORTANT** : The accumulated time of the buffer stored at room temperature must not exceed **20 days**. This time of 20 day storage takes account of the time for the buffer to come to room temperature.

Discard buffer if it changes its appearance, e.g., becomes cloudy due to microbial contamination.

*NOTE : During storage, the buffer may present a slight color without any adverse effects on its performance.*

## 2. HEMOLYSING SOLUTION

### Preparation

Hemolysing Solution is ready to use. It contains : components, nonhazardous at the concentration used, necessary for optimum performance.

### Use

To dilute and hemolyze whole blood.

### Storage, stability and signs of deterioration

Store hemolysing solution at room temperature (15 to 30 °C) or refrigerated (2 to 8 °C). It is stable until the expiration date indicated on the kit package or hemolysing solution vial label. DO NOT FREEZE.

Discard hemolysing solution if it changes its appearance, e.g., becomes cloudy due to microbial contamination.

*NOTE : During storage, hemolysing solution may turn yellow without any adverse effects on its performance.*

## 3. WASH SOLUTION

### Preparation

The vial of the stock wash solution should be diluted up to 250 mL with distilled or deionized water.

After dilution, the wash solution contains an alkaline solution pH  $\approx 12$ .

### Use

For washing the capillaries before HbA<sub>1c</sub> electrophoresis.

**IMPORTANT** : Before filling the wash solution container, it is recommended to wash the connector and the tube with plenty of distilled or deionized water to avoid salts deposit.

### Storage, stability and signs of deterioration

Store the stock and working wash solutions in closed containers at room temperature or refrigerated. The stock wash solution is stable until the expiration date indicated on the kit or wash solution vial label. Working wash solution is stable for 3 months.

Discard working wash solution if it changes its appearance, e.g., becomes cloudy due to microbial contamination.

## 4. REAGENT CUPS

### Use

Single use cups for blood samples dilution and migration on the automated instrument. To place on the automated loading system for cups of MINICAP FLEX-PIERCING. One cup is intended for the analysis of 2 blood samples.

**WARNING** : *Reagent cups with biological samples have to be handled with care.*

## 5. FILTERS

### Use

Disposable filters for filtration of analysis buffer, working wash solution and distilled or deionized water (used for capillaries rinsing).

**IMPORTANT** : Replace all filters simultaneously upon opening a new kit.

Screw one filter at the connector situated at the extremity of each tube that plunges in the vials of buffer, wash solution and distilled or deionized water. When setting filters on MINICAP FLEX-PIERCING instrument, rinse the connectors and the tubes with distilled or deionized water.

### Storage

Before use, store the filters in their sealed package in a dry place at room temperature or refrigerated.

## 6. BINS FOR USED CUPS

### Use

Bins intended for automated collection of used reagent cups in MINICAP FLEX-PIERCING. To place in MINICAP FLEX-PIERCING at the location intended for this purpose.

**WARNING :** *Bins containing used reagent cups with biological samples have to be handled with care.*

## 7. HEMOLYSING SOLUTION BAR CODE LABELS

### Use

Labels to identify the tube containing the hemolysing solution (HbA1c HEMOLYSING SOLUTION).

## REAGENTS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

**WARNING :** *See the safety data sheets.*

### 1. Hb A1c CAPILLARY CALIBRATORS

#### Composition

Hb A1c CAPILLARY Calibrators (SEBIA, PN 4755) are obtained from pools of human blood samples. They contain stabilizers and preservatives to maintain the stability of the hemoglobin fractions. The calibrators are in a stabilized lyophilized form.

Hb A1c CAPILLARY Calibrator 1 presents a normal HbA<sub>1c</sub> level and Hb A1c CAPILLARY Calibrator 2 presents an elevated HbA<sub>1c</sub> level.

#### Intended use

The Hb A1c CAPILLARY Calibrators 1 and 2 are designed for the calibration and migration control of human glycated hemoglobin A<sub>1c</sub> quantification with MINICAP Hb A1c electrophoresis procedure performed with the MINICAP FLEX-PIERCING automated instrument for capillary electrophoresis, in order to achieve results in patient blood samples that are comparable to the DCCT study and traceable to the IFCC reference system.

The recommendations to calibrate are the following :

- **Perform 3 successive series of analyses with both calibrators :**
  - for the first use of the "Hb A1c" analysis program with the MINICAP FLEX-PIERCING instrument ;
  - after having changed a capillary ;
  - after having changed the lot number of calibrators.
- **Perform 1 series of analyses with both calibrators, and then with 1 of the 2 controls, before starting a new analysis sequence :**
  - after having changed the lot number of analysis buffer ;
  - after technical operation ;
  - in case of analyses of controls giving HbA<sub>1c</sub> values outside the expected values (and after having confirmed this deviation by a second analysis of blood controls) ;
  - at least every 2 months.

**NOTE :** *It is not necessary to calibrate the instrument after having changed the lot number of hemolysing solution.*

### Use

#### IMPORTANT :

- For optimal use of each Hb A1c CAPILLARY Calibrator with the MINICAP FLEX-PIERCING instrument, it is necessary to use one specific tube designed for blood controls and its corresponding cap (see "EQUIPMENT AND ACCESSORIES REQUIRED", Tubes and caps for Controls) and to identify this tube with the corresponding calibrator bar code label.
- Both calibrators must imperatively be analyzed for an effective calibration : the run order of both calibrators is indifferent, but they must be analyzed within the same working day.
- Reconstitute each lyophilized Hb A1c CAPILLARY Calibrator 1 and 2 vial with the volume of distilled or deionized water and according to the procedure indicated in the package insert of the Hb A1c CAPILLARY Calibrators. Mix gently the calibrator vial to dissolve the whole lyophilized blood, ensure that no liquid contacts the cap. Allow to stand for 30 minutes at 2 – 8 °C and mix gently (avoid formation of foam).
- NOTE :** *The precision of the reconstitution volume to be maintained is  $\pm 1.0$  %.*
- Apply each reconstituted calibrator in a tube designed for blood control.
- Close the tube with its cap.
- Identify the tube with the specific bar code label of the calibrator.
- The analysis of each calibrator must be performed according to the same procedure as described below.
- For each calibrator, place the tube (identified with the Calibrator bar code label), in position No. 28 on a MINICAP FLEX-PIERCING rotating sampler ("Control" position with centering ring).
- Pour 5 mL of MINICAP Hb A1c hemolysing solution in a hemolysing tube (identified with the hemolysing solution bar code label) without introducing air bubbles and place it in position No. 27 on the rotating sampler ("Diluent / Solution" position without any centering ring) (A message will be displayed if the tube or the hemolysing solution is missing).

**IMPORTANT :** Ensure the absence of foam in the tube before placing it on the rotating sampler.

- **Do not place any sample tube in positions 1 to 26 of the rotating sampler.**
- Slide the rotating sampler into the MINICAP FLEX-PIERCING instrument.
- Close the doors of the MINICAP FLEX-PIERCING instrument, the analysis starts automatically.
- Enter in the window which appears on the screen the parameters of the analyzed calibrator, indicated in the package insert of the Hb A1c CAPILLARY Calibrators : HbA<sub>1c</sub> level in mmol/mol, lot number and expiration date, select the number of analyses of the calibrator to perform, according to the indications previously described, and validate.

**NOTE :** *HbA<sub>1c</sub> concentration is indicated in IFCC unit (mmol/mol).*

- The results are then automatically considered by the software for the data analysis.
- Remove the tube with calibrator from position 28 as soon as the window appears indicating to remove the tube.
- When the analysis of the first calibrator is completed, perform the analysis of the second calibrator according to the same procedure.

**WARNING :** *After having closed the doors of the instrument, start the analysis of the second calibrator using the "Click to run the control in position 28" button.*

**IMPORTANT :** For optimal use of each Hb A1c CAPILLARY Calibrator, it is necessary to use one bar code label intended to identify the tube for control which contains the calibrator (close the tube with its specific cap before using it). The software displays the HbA<sub>1c</sub> value for both calibrators that has been entered by the operator.

## Storage, stability and signs of deterioration

See the package insert of the Hb A1c CAPILLARY Calibrators.

**WARNING :** No test method can provide an absolute assurance of the absence of HIV, hepatitis B and C or other infectious agents. Therefore, handle the Hb A1c CAPILLARY Calibrators as a hazardous biological material.

These lots of bloods were found negative on assays approved by FDA or EU equivalent regulatory agency :

- against hepatitis B surface antigen ;
- for antibody to HCV ;
- for antibody to HIV1 and HIV2.

## 2. Hb A1c CAPILLARY CONTROLS

### Composition

Hb A1c CAPILLARY Controls (SEBIA, PN 4774) are obtained from pools of human blood samples. They contain stabilizers and preservatives to maintain the stability of the hemoglobin fractions. The controls are in a stabilized lyophilized form.

Hb A1c CAPILLARY Control 1 presents a normal HbA<sub>1c</sub> level and Hb A1c CAPILLARY Control 2 presents an elevated HbA<sub>1c</sub> level.

### Intended use

The Hb A1c CAPILLARY Controls 1 and 2 are designed for the quality control of human glycated hemoglobin A<sub>1c</sub> quantification with MINICAP Hb A1c electrophoresis procedure performed with the MINICAP FLEX-PIERCING automated instrument for capillary electrophoresis.

The values obtained must fall within the range determined for each batch.

**IMPORTANT :** For optimal use of each Hb A1c CAPILLARY Control with the MINICAP FLEX-PIERCING instrument, it is necessary to use one specific tube designed for blood controls and its corresponding cap (see "EQUIPMENT AND ACCESSORIES REQUIRED", Tubes and caps for Controls) and to identify this tube with the corresponding control bar code label.

### Determination of customized values for Hb A1c CAPILLARY Controls :

Each laboratory must establish values for Hb A1c CAPILLARY Controls 1 and 2 that are specific for each MINICAP FLEX-PIERCING automated instrument according to the procedure indicated in the package insert of the Hb A1c CAPILLARY Controls.

**WARNING :** *The determination of controls values must always be performed :*

- *after the first calibration of the MINICAP FLEX-PIERCING instrument,*
- *after having changed one or many capillaries,*
- *after having changed the lot number of calibrators or controls.*

See the package insert of the Hb A1c CAPILLARY Controls.

### Quality control :

- The recommendations to analyze one of the two controls on both capillaries are the following :
  - after capillaries activation ;
  - after each calibration of the instrument performed with the Hb A1c CAPILLARY Calibrators ;
  - after a capillary cleaning sequence with CAPICLEAN ;
  - before starting a new analysis sequence ;
  - after the analysis of a complete rotating sampler, by alternating Hb A1c CAPILLARY Control 1 and Control 2 for high-volume testing laboratories.
- Reconstitute each lyophilized Hb A1c CAPILLARY Control 1 and 2 vial with the volume of distilled or deionized water indicated in the package insert of the Hb A1c CAPILLARY Controls. Allow to stand for 30 minutes and mix gently (avoid formation of foam).
 

*NOTE : The precision of the reconstitution volume to be maintained is  $\pm 1.0$  %.*
- Apply each reconstituted control in a tube designed for blood control.
- Close the tube with its cap.
- Identify the tube with the specific bar code label of the control.
- The analysis of each control must be performed according to the same procedure as described below.
- For each control, place the tube (identified with the Control bar code label), in position No. 28 on a MINICAP FLEX-PIERCING rotating sampler ("Control" position with centering ring).
- Pour 5 mL of MINICAP Hb A1c hemolysing solution in a hemolysing tube (identified with the hemolysing solution bar code label) without introducing air bubbles and place it in position No. 27 on the rotating sampler ("Diluent / Solution" position without any centering ring) (A message will be displayed if the tube or the hemolysing solution is missing).

**IMPORTANT :** Ensure the absence of foam in the tube before placing it on the rotating sampler.

- Slide the rotating sampler into the MINICAP FLEX-PIERCING instrument.
- Close the doors of the MINICAP FLEX-PIERCING instrument, the analysis starts automatically.
- In the window which appears on the screen, select the number of analyses of the Hb A1c CAPILLARY Control to perform and validate.
- The results are then automatically considered by the software for the data analysis.

- Remove the tube with control from position 28 as soon as the window appears indicating to remove the tube.
- Perform the analysis of the second control according to the same procedure.

**WARNING : After having closed the doors of the instrument, if the analysis of the second blood control is performed within the same day than that of the first blood control, start this analysis using the "Click to run the control in position 28" button. Do not place any sample tube in positions 1 to 26 of the rotating sampler.**

- Check the concentration levels and percentages for HbA<sub>1c</sub> fraction obtained from the analyses of controls with established customized values of the instrument. They must fall within the range determined for each batch. If not, calibrate again the instrument with the Hb A1c CAPILLARY Calibrators (see § "Hb A1c CAPILLARY CALIBRATORS").

**NOTE :** HbA<sub>1c</sub> concentration displayed by the software is indicated in mmol/mol, without any decimal place according to IFCC recommendations. This decimal place is however considered for the characterization of the sample (as normal sample or sample with elevated HbA<sub>1c</sub> level), statistics and Levey Jennings charts.

**IMPORTANT :** For optimal use of each Hb A1c CAPILLARY Control, it is necessary to use one bar code label intended to identify the tube for control which contains the blood control (close the tube with its specific cap before using it).

## Storage, stability and signs of deterioration

See the package insert of the Hb A1c CAPILLARY Controls 1 and 2.

**WARNING :** No test method can provide an absolute assurance of the absence of HIV, hepatitis B and C or other infectious agents. Therefore, handle the Hb A1c CAPILLARY Controls as a hazardous biological material.

These lots of bloods were found negative on assays approved by FDA or EU equivalent regulatory agency :

- against hepatitis B surface antigen ;
- for antibody to HCV ;
- for antibody to HIV1 and HIV2.

## 3. DISTILLED OR DEIONIZED WATER

### Use

For rinsing capillaries in automated instrument MINICAP FLEX-PIERCING, SEBIA, for capillary electrophoresis.

It is recommended to filter distilled or deionized water with 0.45 µm filter before use.

To prevent microbial proliferation, change the water every day. In case of longer storage, add 35 µL/dL of CLEAN PROTECT (SEBIA, PN 2059, 5 mL).

**IMPORTANT :** Before filling the rinse container, it is recommended to wash it with plenty of distilled or deionized water.

## 4. CAPICLEAN

### Composition

The vial of CAPICLEAN concentrated solution (SEBIA, PN 2058, 25 mL) contains : proteolytic enzymes, surfactants and additives nonhazardous at concentrations used, necessary for optimum performances.

### Use

For sample probe cleaning in the SEBIA MINICAP FLEX-PIERCING automated instrument, for capillary electrophoresis, during the CAPICLEAN cleaning sequence.

**IMPORTANT :** Launch a CAPICLEAN cleaning sequence at least once a week and at maximum once a day, or after every 500 analyses when performed within less than one week.

See the instruction sheets of CAPICLEAN, SEBIA.

**WARNING : Do not use a capped tube.**

**IMPORTANT :** For optimal use of the CAPICLEAN solution with the MINICAP FLEX-PIERCING instrument, it is necessary to use one bar code label intended to identify the hemolysing tube holding the microtube which contains the diluted CAPICLEAN solution (cut the cap of the microtube before using it).

## Storage, stability and signs of deterioration

Store CAPICLEAN refrigerated (2 – 8 °C). It is stable until the expiration date indicated on the vial label. DO NOT FREEZE.

Precipitate or combined particles in suspension (flocules) may be observed in the CAPICLEAN vial without any adverse effects on its utilization.

Do not dissolve this precipitate or these particles. It is recommended to collect only the supernatant.

For later use, store the tube containing the diluted solution at 2 – 8 °C. It must be used within the day.

## 5. SODIUM HYPOCHLORITE SOLUTION (for sample probe cleaning)

### Preparation

Prepare a sodium hypochlorite solution (2 % to 3 % chloride) by diluting 250 mL 9.6 % chloride concentrated solution to 1 liter with cold distilled or deionized water.

### Use

For the sample probe cleaning in the MINICAP FLEX-PIERCING instrument (weekly maintenance in order to eliminate adsorbed proteins from the probe).

See the SEBIA MINICAP FLEX-PIERCING instruction manual.

**WARNING : Do not use a capped tube.**

- Apply in a microtube 500 µL of diluted chlorinated solution previously prepared.
- Cut the cap of the microtube.
- Place the microtube, located on a new hemolysing tube used as a support (identified with one bar code label specific to the sodium hypochlorite solution), on the rotating sampler of MINICAP FLEX-PIERCING.

- Position a new reagent cup on the automated loading system for cups of MINICAP FLEX-PIERCING (a message will be displayed if the reagent cup is missing).
- Slide the rotating sampler into the MINICAP FLEX-PIERCING instrument.
- Close the doors of the MINICAP FLEX-PIERCING instrument, the cleaning sequence starts automatically.

**IMPORTANT** : For optimal use of the sodium hypochlorite solution with the MINICAP FLEX-PIERCING instrument, it is necessary to use one bar code label intended to identify the hemolysing tube holding the microtube which contains the solution (cut the cap of the microtube before using it).

### Storage, stability and signs of deterioration

Store the working chlorinated solution at room temperature in a closed container, it is stable for 3 months. Avoid storage in sunlight, close to heat and ignition source, and to acids and ammonia.

## 6. CAPILLARYS / MINICAP WASH SOLUTION

### Preparation

Each vial of the stock CAPILLARYS / MINICAP Wash solution (SEBIA, PN 2052, 2 vials, 75 mL) should be diluted up to 750 mL with distilled or deionized water.

After dilution, the wash solution contains an alkaline solution pH  $\approx$  12.

For MINICAP FLEX-PIERCING, it is convenient to dilute only 25 mL of the stock solution to 250 mL with distilled or deionized water.

### Use

For washing the MINICAP FLEX-PIERCING capillaries.

**IMPORTANT** : Before filling the wash solution container, it is recommended to wash the opening of the container, the connector and the tube with plenty of distilled or deionized water to avoid salts deposit.

### Storage, stability and signs of deterioration

Store the stock and working wash solutions in closed containers at room temperature or refrigerated. The stock wash solution is stable until the expiration date indicated on the kit or wash solution vial label.

Working wash solution is stable for 3 months.

Discard working wash solution if it changes its appearance, e.g., becomes cloudy due to microbial contamination.

### NOTES :

*The assays that were performed for the validation of reagents demonstrated that, for the different solutions and using an adapted equipment for the reconstitution volume, a variation of  $\pm 5\%$  on the final volume has no adverse effect on the analysis.*

*The distilled or deionized water used to reconstitute solutions, must be free of bacterial proliferation and mold (use a 0.22  $\mu\text{m}$  filter) and have a resistivity higher than 10 Megohms x cm.*

## EQUIPMENT AND ACCESSORIES REQUIRED

1. MINICAP FLEX-PIERCING instrument, SEBIA, PN 1232.
2. Update HbA1c kit for MINICAP FLEX-PIERCING, SEBIA, PN 1238.
3. Rotating sampler supplied with MINICAP FLEX-PIERCING, equipped with centering rings for MINICAP FLEX-PIERCING (specific for the MINICAP Hb A1c procedure) for 13 mm diameter tubes.
4. MINICAP FLEX-PIERCING centering rings for 11 mm diameter tubes, SEBIA (27 units), PN 1612.
5. Container Kit supplied with MINICAP FLEX-PIERCING : Rinse container (to fill with distilled or deionized water) and waste container.
6. Collection tubes with 13 mm diameter and their corresponding caps (maximal length of tube with cap : 100 mm, maximal diameter of cap : 17 mm) : for example, BD Vacutainer, Terumo Venosafe 5 mL, Greiner Bio-one Vacuette 1, 2, 3 or 4 mL or Sarstedt S-Monovette 4 mL tubes (13 x 75 mm), or collection tubes with 11 mm diameter and their corresponding caps (maximal length of tube with cap : 100 mm, maximal diameter of cap : 17 mm) : for example, Sarstedt S-Monovette 2,7 mL or Kabe Labortechnik Primavette S 2,6 mL tubes (11 x 66 mm), or collection tubes with equivalent dimensions approved for clinical assays.
7. Tubes and caps for Controls, SEBIA, PN 9205 : 500 conical tubes and their caps to analyze calibrators, blood controls and particular samples with the MINICAP FLEX-PIERCING instrument.
8. Hemolysing tubes (with 8 to 16 mm diameter and 50 to 100 mm length).
9. "AUTOMATIC LOW VOLUME" bar code labels, SEBIA (20 units), PN 9208 : labels intended to identify samples with volume less than 1 mL for an analysis using the "automatic dilution" mode.
10. "MANUAL LOW VOLUME" bar code labels, SEBIA (20 units), PN 9209 : labels intended to identify samples with volume less than 1 mL for an analysis using the "manual dilution" mode.
11. MINICAP Reagent cups, SEBIA (250 units), PN 2280.
12. Lids for bins for used reagent cups, SEBIA (12 units), PN 2286 : lids to close the bins containing used cups.

## SAMPLES FOR ANALYSIS

### Sample collection and storage

Fresh anticoagulated whole blood samples collected in tubes containing  $\text{K}_2\text{EDTA}$  or  $\text{K}_3\text{EDTA}$  as anticoagulant are recommended for analysis. Blood must be collected according to established procedures used in clinical laboratory testing.

Samples can be stored for 7 days maximum between 2 and 8 °C or 18 hours maximum at room temperature (between 15 and 30 °C).

For longer storage, samples can be frozen at - 80 °C within 8 hours of collection without any preparation.

Frozen blood samples are stable for 3 months maximum at - 80 °C.

**IMPORTANT** : For optimal storage of blood samples, store them at - 80 °C. Do not store at - 20 °C.

## Sample preparation

- Use directly whole blood samples.
- Check that all the tubes contain 1 mL minimum of blood and are perfectly closed.
- **Vortex for 5 seconds blood samples stored at 2 - 8 °C for one week or stored at - 80 °C.**

**WARNING : The tubes must be closed with their corresponding caps designed for the MINICAP Hb A1c procedure with the MINICAP FLEX-PIERCING instrument (see EQUIPMENT AND ACCESSORIES REQUIRED).**

### Particular cases :

**IMPORTANT :** The following samples must be identified with the "LOW VOLUME AUTO" or "LOW VOLUME MANUAL" bar code label ; these labels allow the instrument to apply respectively the automatic or manual dilution mode according to the sample preparation procedure. These samples must be placed on the rotating sampler at the beginning of an analysis series and the bar code of each tube must be visible in the opening of the rotating sampler. Without any bar code label, the analysis should be affected.

### Analysis of samples with volume below 1 mL :

- Vortex for 5 seconds the whole blood sample and prepare the sample according to its volume following one of the 2 protocols.

#### 1. Volume of sample comprised between 200 $\mu$ L and 1 mL :

- Apply at least 200  $\mu$ L of whole blood to analyze in a conical tube for control (identified with a "LOW VOLUME AUTO" bar code label) and cap the tube.
- Place the tube on the rotating sampler of the MINICAP FLEX-PIERCING instrument at the beginning of an analysis series and slide the rotating sampler into the instrument to run the analysis without any delay.
- Close the doors of the MINICAP FLEX-PIERCING instrument, the analysis starts automatically.

or

#### 2. Volume of sample below 200 $\mu$ L :

- Apply 50  $\mu$ L of whole blood to analyze in a conical tube for control (identified with a "LOW VOLUME MANUAL" bar code label) and 250  $\mu$ L of MINICAP Hb A1c hemolysing solution and cap the tube.
- Vortex for 5 seconds.
- Place the tube on the rotating sampler of the MINICAP FLEX-PIERCING instrument at the beginning of an analysis series and slide the rotating sampler into the instrument to run the analysis without any delay.
- Close the doors of the MINICAP FLEX-PIERCING instrument, the analysis starts automatically.

The results are then automatically considered by the software for the data analysis.

**NOTES :** The minimal volume of sample to analyze in a conical tube is 200  $\mu$ L. Without any bar code label on the conical tube, the sample cannot be identified and the dilution mode (automatic or manual according to the sample preparation procedure) cannot be applied.

## Samples to avoid

- Avoid coagulated blood samples.
- Avoid aged, improperly stored blood samples ; the automated hemolysis of samples may be disturbed by viscous aggregates in red blood cells. Then, degradation products (as artefacts) may affect the electrophoretic pattern : an additional fraction may migrate particularly to Hb A2 position or more anodically than Hb A0 (in the "other Hb A" position) when analyzing such samples.  
In these 2 previous cases, aggregates in red blood cells may affect the collection of the sample by the probe.
- Do not analyze directly tubes containing less than 1 mL of blood sample, the analysis should be affected (see particular cases).

## PROCEDURE

The MINICAP FLEX-PIERCING instrument is a multiparameter instrument for hemoglobins analysis on parallel capillaries. The hemoglobins assay uses 2 capillaries to run the samples.

The sequence of automated steps is as follows :

- Bar code reading of rotating sampler and sample tubes (for up to 26 tubes) ;
- Mixing of blood samples before analysis ;
- Sample hemolysis and dilution from primary tubes into reagent cups ;
- Capillary washing ;
- Injection of hemolyzed samples ;
- Hemoglobin separation and direct detection of the separated hemoglobins on capillaries.

The manual steps include :

- Placement of sample tubes (with caps) in rotating sampler in positions 1 to 26 ;
- Placement of the uncapped hemolysing solution tube in rotating sampler in position 27 ;
- Placement of the Hb A1c Capillary Calibrators and Controls in rotating sampler in position 28 ;
- Placement of the rotating sampler in the MINICAP FLEX-PIERCING instrument ;
- Removal of the sample tubes after analysis ;
- Removal and closing of the bins for used cups.

PLEASE CAREFULLY READ THE MINICAP FLEX-PIERCING INSTRUCTION MANUAL.

## I. PREPARATION OF MINICAP ANALYSIS

1. Switch on MINICAP FLEX-PIERCING instrument and computer.
2. In order to start the instrument, position at least one new reagent cup on the automated loading system for cups of MINICAP FLEX-PIERCING (a message will be displayed if a reagent cup is missing).
3. Set up the software, the instrument automatically starts.
4. The MINICAP Hb A1c kit is intended to run with "Hb A1c" analysis program from the MINICAP FLEX-PIERCING instrument. To select "Hb A1c" analysis program and place the MINICAP Hb A1c buffer vial in position "B2" in the instrument, please read carefully the MINICAP FLEX-PIERCING instruction manual and follow the instructions displayed on the screen.
5. Position new reagent cups on the automated loading system for cups of MINICAP FLEX-PIERCING (a message will be displayed if the reagent cups are missing).
6. **Position a bin for used cups in MINICAP FLEX-PIERCING at the location intended for this purpose.**
7. Check the fill level of the reagent vials, add reagent if necessary and empty the waste container. In the window "Check reagent levels", update the software by moving the cursor buttons.
8. The rotating sampler contains 28 positions for sample tubes :
  - Place up to 26 capped sample tubes with whole blood on the rotating sampler with specific centering rings (positions No. 1 to 26), the bar code of each tube must be visible in the opening of the rotating sampler.
  - Pour the MINICAP Hb A1c hemolysing solution in an uncapped hemolysing tube, identified with the hemolysing solution bar code label, without introducing air bubbles : 2 mL for the analysis of 1 or 2 samples, 5 mL for the analysis of 12 samples. Place this tube in position No. 27 without any centering ring on the rotating sampler ("Diluent / Solution" position).

*NOTE : 5 mL of hemolysing solution applied in a 13 x 75 mm tube will allow to perform 12 analyses ; 10 mL of hemolysing solution applied in a 16 x 100 mm tube will allow to perform 24 analyses.*

**IMPORTANT :** Ensure the absence of foam in the tube before placing it on the rotating sampler.

  - Place one of the 2 Hb A1c Capillary Controls in position No. 28 on the rotating sampler ("Control" position) and select the number of analyses to perform according to the indications previously described, see "Hb A1c Capillary Controls" paragraph, part "Quality control".

**IMPORTANT :** If a tube is missing in position No. 1 (sample tube), in position No. 27 (hemolysing solution tube) and in position No. 28 (blood control or calibrator tube), the analysis cannot start and a message will be displayed.

*NOTE : When using a control blood or a calibrator, it is necessary to use the specific bar code label.*
9. Slide the rotating sampler into the MINICAP FLEX-PIERCING instrument.
10. Close the doors of the MINICAP FLEX-PIERCING instrument, the analysis starts automatically.
11. After the analysis, remove the rotating sampler with analyzed sample tubes.
12. If necessary, take off carefully the bin containing used reagent cups, close it tightly with the corresponding lid and discard it.

**WARNING : Bins containing used reagent cups with biological samples have to be handled with care.**

## DILUTION - MIGRATION - DESCRIPTION OF THE AUTOMATED STEPS

1. Bar codes are read on both rotating sampler and sample tubes.
2. Mixing of tubes.
3. Samples are diluted in hemolysing solution and the sample probe is rinsed after each sample.
4. Capillaries are washed.
5. Diluted samples are injected into capillaries.
6. Migration is carried out under constant voltage for about 9 minutes and the temperature is controlled by Peltier effect.
7. Hemoglobins are detected directly by scanning at 415 nm and an electrophoretic profile appears on the screen of the system.

*NOTE : These automated steps are described for the two first analyzed sample tubes. The electrophoretic patterns appear after about 20 minutes from the start of the analysis. For the following sample tubes, the first three steps (bar code reading, mixing and hemolysis of blood samples) are performed during the analysis of the 2 previous samples.*

## II. RESULT ANALYSIS

At the end of the analysis, relative quantification of individual HbA<sub>1c</sub> fraction is performed automatically.

The HbA<sub>1c</sub> concentrations are standardized and indicated in percentages (with one decimal place) and in mmol/mol (without any decimal place) according to IFCC recommendations (Ragnar Hanas *et al*, 2010).

*NOTE : As the sample is characterized as normal or with elevated HbA<sub>1c</sub> level using the real value of HbA<sub>1c</sub> concentration in mmol/mol (whole number calculated by the software for the data analysis), a discordance may appear for HbA<sub>1c</sub> levels close to the threshold value.*

The identification of normal blood samples and of blood samples with elevated HbA<sub>1c</sub> level is automatically performed and the profiles can be distinguished in the curve review window of patterns by a blue color for normal samples and a orange color for samples with elevated HbA<sub>1c</sub> level :

- Normal blood samples, with "normal" HbA<sub>1c</sub> concentration lower than 42 mmol/mol (6.0 %) or equal are indicated in blue color.
- Blood samples with elevated HbA<sub>1c</sub> concentration, higher than 42 mmol/mol (6.0 %), are indicated in orange color.

Electrophoretic patterns with abnormality (such as an additional fraction or deletion of a normal fraction among HbA<sub>1c</sub>, Other Hb A, Hb A0 and Hb A2 fractions) are indicated in purple color with "Atypical profile" and "Hb A1c (\*)" indications.

Patterns are automatically adjusted with regard to Hb A0 fraction to facilitate their interpretation.

The following table presents the warning and message signals that are displayed and the procedures to follow according to the analyzed sample :

| Warning signal<br><br>Analyzed sample       | <br>HbA <sub>1c</sub> value outside specifications for calibrators                                                                                                                                                                                                         | <br>No detection of Hb A0 and / or HbA <sub>1c</sub> fraction                                                                                         | <br>Insufficient optical density for Hb A0 fraction                                          | "Atypical profile" (presence of an additional fraction or deletion of a normal fraction) | <br>HbA <sub>1c</sub> value outside the expected values for controls analyzed with the Quality Control (QC) mode |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Calibrators identified with bar code labels | Warning message : "analysis of the calibrator not in conformity": analyze a control blood in position 28 or repeat the calibration [in case of invalid calibration on one (or 2) capillary(ies), the capillary(ies) is(are) deactivated, the HbA <sub>1c</sub> level from blood samples and controls on the concerned capillary(ies) is then not displayed] |                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                               |                                                                                          | /                                                                                                                                                                                                 |
| Controls identified with bar code labels    | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | No HbA <sub>1c</sub> value displayed                                                                                                                                                                                                   | /                                                                                                                                                                             | /                                                                                        | With the Quality Control mode: "+" or "-" identification according to the HbA <sub>1c</sub> level compared to the customized values entered by the operator.                                      |
|                                             | /                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Warning message: "analysis of the control not in conformity":<br>1. repeat the analysis using the same vial in position 28,<br>2. repeat the analysis with a new vial,<br>3. call SEBIA Technical Service if the failure is confirmed. |                                                                                                                                                                               |                                                                                          | With the Quality Control mode, if the warning message "analysis of the control not in conformity" is displayed, repeat the calibration.                                                           |
| Blood sample from patient                   | No HbA <sub>1c</sub> value displayed (when Hb F > 15 %, shoulder on HbA <sub>1c</sub> or on Hb A0)                                                                                                                                                                                                                                                          | Suspect the presence of a Hb variant or a failure in the adjustment of the electrophoretic patterns, repeat the analysis for confirmation.                                                                                             | Warning message: "too low OD" (< 0.07) for a blood sample that is not abnormal, repeat the analysis: if the result is confirmed, the HbA <sub>1c</sub> level can be reported. | "atypical profile" and "HbA1c (*)" : suspect the presence of a Hb variant.               | /                                                                                                                                                                                                 |

When a sample has a Hb A2 percentage higher than 3.0 %, an exclamation mark is displayed near the name of the fraction ("Hb A2 !"). Then, a beta thalassemia syndrome, that could affect the HbA<sub>1c</sub> synthesis, may be suspected (case of physio-pathological interference). It is recommended to analyze the sample with the MINICAP HEMOGLOBIN(E) procedure to verify the Hb A2 percentage and to study the patient's clinical data. However, the HbA<sub>1c</sub> quantification represents a useful relative follow up index for the same patient.

PLEASE CAREFULLY READ THE MINICAP FLEX-PIERCING INSTRUCTION MANUAL.

### III. END OF ANALYSIS SEQUENCE

At the end of each analysis sequence, the operator must initiate the "shut down" procedure of the MINICAP FLEX-PIERCING in order to store capillaries in optimal conditions.

**IMPORTANT** : Position at least one new reagent cup on the automated loading system for cups of MINICAP FLEX-PIERCING (a message will be displayed if a reagent cup is missing).

### IV. FILLING OF REAGENT CONTAINERS

The MINICAP FLEX-PIERCING instrument has a reagent automatic control.

**IMPORTANT** : Please refer to the instructions for replacement of reagent containers respecting color code for vials and connectors.

A message will be displayed when it is necessary to perform one of the following tasks :

- Place a new buffer vial and / or ;
- Fill the container with working wash solution and / or ;
- Fill the container with filtered distilled or deionized water for rinsing capillaries and / or ;
- Empty the waste container.

**WARNING** : Do not use marketed deionized water, such as water for ironing for example (risk of important capillaries damage). Use only water with ultrapure quality, such as injection grade water.

**IMPORTANT** : Before filling the rinse container, it is recommended to wash it with plenty of distilled or deionized water.

PLEASE CAREFULLY READ THE MINICAP FLEX-PIERCING INSTRUCTION MANUAL.

## QUALITY CONTROL

After capillaries activation, after each calibration of the instrument performed with the Hb A1c CAPILLARY Calibrators, after a capillary cleaning sequence with CAPICLEAN and before starting a new analysis sequence, it is necessary to run analyses with Hb A1c CAPILLARY Controls 1 or 2, SEBIA, PN 4774.

In addition, for high-volume testing laboratories, it is advised to analyze one of the two controls after the analysis of a complete rotating sampler, by alternating Hb A1c CAPILLARY Control 1 and Control 2.

**WARNING :** When controls values fall out of the customized values range, the samples analyzed on the affected capillary(ies), since the last validated quality control, must be analyzed again.

**IMPORTANT :** For optimal use of the blood controls analyzed with the MINICAP FLEX-PIERCING instrument, it is necessary to use the specific conical tubes for controls and their corresponding caps (see "EQUIPMENT AND ACCESSORIES REQUIRED") and the bar code labels intended to identify the tubes for controls that contain the blood control to analyze.

\* US customers : Follow federal, state and local guidelines for quality control.

## RESULTS

### Values

Direct detection at 415 nm in capillaries yields relative concentrations (percentages) of individual hemoglobin zones, and specially the calibrated HbA<sub>1c</sub> concentration.

Hemoglobin A<sub>1c</sub> normal values :  $\leq 42$  mmol/mol (6.0 %) (Geistanger *et al.* 2008).

For further information, please refer to : [http://www.ifcchba1c.net/IFCC\\_08.asp?type=N](http://www.ifcchba1c.net/IFCC_08.asp?type=N)

### Interpretation

See ELECTROPHORETIC PATTERNS.

### Interferences

**NOTE :** The common interfering factors with the MINICAP Hb A1c procedure (triglycerides, bilirubin, ascorbic acid, urea, rheumatoid factor, glybclamide, carbamylated hemoglobin, labile HbA<sub>1c</sub> and Hb F) were evaluated in studies based on the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - USA) EP7-A2 guideline "Interference Testing in Clinical Chemistry".

The results are summarized below.

- No interference with the MINICAP Hb A1c procedure was detected due to the blood sample's high concentration of the following interfering factors tested at levels equal to the concentrations listed below :

| Interfering factor | Concentration            |
|--------------------|--------------------------|
| Triglycerides      | 3.07 g/dL (35.1 mM)      |
| Bilirubin          | 25.8 mg/dL (442 $\mu$ M) |
| Ascorbic acid      | 60 mg/dL (3.41 mM)       |
| Urea               | 291 mg/dL (48.5 mM)      |
| Rheumatoid factor  | 2178 IU/mL               |
| Glybclamide        | 3 mg/dL                  |

- No interference with the MINICAP Hb A1c procedure was detected due to the presence of carbamylated hemoglobin ( $\leq 8.7$  %) and labile HbA<sub>1c</sub> ( $\leq 14.8$  %).
- Levels of Hb F up to 15 % in the blood sample do not interfere with HbA<sub>1c</sub> fraction quantification, but no HbA<sub>1c</sub> result will be reported by the software when Hb F level is higher than 15 %.
- Analysis with hemoglobin variants :**
  - Glycated forms of common hemoglobin variants (Hb S, Hb C, Hb D or Hb E for example) co-migrate with Hb A0 fraction or minor Hb A1 fractions ("other Hb A" fraction) without any modification of the HbA<sub>1c</sub> result.
  - Some hemoglobin variants may appear as a shoulder of Hb A0 fraction that may not be detected by the software. Only a visual examination of the electrophoretic pattern allows the detection of this shoulder. Do not report any HbA<sub>1c</sub> result in that case. It is necessary to analyze the hematologic state and to perform complementary studies in order to confirm the presence of a variant.
  - In addition, among variants which migrate close to Hb A0, or joined with Hb A0, some of them may show an additional fraction ("X1c") that migrates separately from HbA<sub>1c</sub>. The electrophoretic pattern will be identified as "Atypical profile". Do not report any HbA<sub>1c</sub> result in that case.
  - When analyzing samples without any Hb A (from homozygous patients or with heterozygous variants S/S or S/C, for example) and when Hb F is present, it may be confused with Hb A0 due to their similar migration positions. No HbA<sub>1c</sub> result will be reported by the software due to the absence of HbA<sub>1c</sub> in this kind of sample.

- Individuals with recent significant blood loss exhibit falsely low HbA<sub>1c</sub> values due to a higher fraction of young erythrocytes.
- Abnormal life span of red blood cells, as found in hemolytic anemias, polycythemia or postsplenectomy, may affect the levels of HbA<sub>1c</sub>. However, the values represent a useful relative follow up index for the same patient.

### Limitations

- See SAMPLES FOR ANALYSIS.
- Analyze only blood samples contained in collection tubes indicated in the paragraph "EQUIPMENT AND ACCESSORIES REQUIRED" or tubes with equivalent dimensions approved for clinical assays. Call SEBIA technical service for further information on these devices.
- Do not analyze directly tubes containing less than 1 mL of blood sample.
- Avoid aged, improperly stored blood samples ; degradation products (or artefacts) may affect the electrophoretic pattern after 7 days storage. When analyzing such samples, an additional fraction may migrate particularly to Hb A2 position or more anodically than Hb A0 (in the "other Hb A" position).
- After 10 days storage, viscous aggregates composed in red blood cells may appear, they must be discarded before analysis.
- In some blood samples from A / C heterozygous patients with Hb F, the Hb A0 fraction may be quantified with imprecision.
- Due to the resolution and sensitivity limits of zone electrophoresis, it is possible that HbA<sub>1c</sub> may not be quantified in presence of all hemoglobin variants with this method.

### Troubleshooting

Call SEBIA Technical Service of the supplier when the test fails to perform while the instruction for the preparation and storage of materials, and for the procedure were carefully followed.

Kit reagent Safety Data Sheets and information on cleaning and waste disposal, labeling and safety rules applied by SEBIA, packaging for the transportation of biological samples, and instruments cleaning are available on the "INSTRUCTIONS & SAFETY DATA SHEETS" DVD.

## PERFORMANCE DATA

### Precision

The precision of the MINICAP Hb A1c procedure was evaluated in a study based on the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - USA) EP5-A2 guideline "Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurements Methods".

The means, standard deviations and coefficients of variation (CV's %) (n = 120) were calculated for HbA<sub>1c</sub> concentration (mmol/mol) and percentage (%) for each sample, using statistical tools recommended by CLSI.

#### Reproducibility between lots and instruments

Six (6) different blood samples were run using the MINICAP Hb A1c procedure in both capillaries of 3 different MINICAP FLEX-PIERCING instruments and with 3 lots of MINICAP Hb A1c kits. The analyzed blood samples included 2 samples with normal HbA<sub>1c</sub> level (No. 1 and 2), 1 sample with HbA<sub>1c</sub> level close to the cut-off value (No. 3) and 3 samples with elevated HbA<sub>1c</sub> level (No. 4, 5 and 6). In this study, each blood sample was analyzed on both capillaries from each instrument, including 60 runs over 10 working days (at 2 different times of the day). Within each run, samples were analyzed in duplicate.

The following tables summarize the within-run and total instrument-reagent C.V. % ranges for the HbA<sub>1c</sub> concentrations (in mmol/mol) and percentages.

|               | Mean (HbA <sub>1c</sub> concentration – mmol/mol) | Within-run reproducibility |            | Total reproducibility |                  |
|---------------|---------------------------------------------------|----------------------------|------------|-----------------------|------------------|
|               |                                                   | CV min (%)                 | CV max (%) | Total CV min (%)      | Total CV max (%) |
| Sample No. 1  | 33                                                | 0.9                        | 3.5        | 0.9                   | 3.5              |
| Sample No. 2  | 36                                                | 1.1                        | 4.0        | 1.2                   | 4.0              |
| Sample No. 3  | 47                                                | 1.2                        | 2.6        | 1.3                   | 2.6              |
| Sample No. 4  | 63                                                | 0.7                        | 1.6        | 0.7                   | 2.2              |
| Sample No. 5  | 76                                                | 0.0                        | 1.4        | 0.0                   | 1.4              |
| Sample No. 6  | 110                                               | 0.4                        | 1.4        | 0.6                   | 2.2              |
| CV (%) ranges |                                                   | 0.0                        | 4.0        | 0.0                   | 4.0              |

|               | Mean (% HbA <sub>1c</sub> ) | Within-run reproducibility |            | Total reproducibility |                  |
|---------------|-----------------------------|----------------------------|------------|-----------------------|------------------|
|               |                             | CV min (%)                 | CV max (%) | Total CV min (%)      | Total CV max (%) |
| Sample No. 1  | 5.2                         | 0.9                        | 2.0        | 0.9                   | 2.2              |
| Sample No. 2  | 5.4                         | 0.9                        | 2.1        | 0.9                   | 2.1              |
| Sample No. 3  | 6.4                         | 0.5                        | 1.9        | 0.8                   | 1.9              |
| Sample No. 4  | 7.9                         | 0.7                        | 1.4        | 0.8                   | 1.6              |
| Sample No. 5  | 9.1                         | 0.0                        | 1.1        | 0.0                   | 1.1              |
| Sample No. 6  | 12.3                        | 0.4                        | 1.2        | 0.6                   | 1.8              |
| CV (%) ranges |                             | 0.0                        | 2.1        | 0.0                   | 2.2              |

### Linearity

The linearity of the MINICAP Hb A1c procedure was evaluated in a study based on the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - USA) EP6-A guideline "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A statistical Approach".

The results for HbA<sub>1c</sub> concentration (mmol/mol) and percentage (%) were analyzed using statistical tools recommended by CLSI.

Two characteristic blood samples, including a normal sample with HbA<sub>1c</sub> concentration at 29 mmol/mol (4.8 % HbA<sub>1c</sub>) and an elevated HbA<sub>1c</sub> level sample with HbA<sub>1c</sub> concentration at 127 mmol/mol (13.8 % HbA<sub>1c</sub>) were mixed within different proportions and the dilutions were electrophoresed with the MINICAP Hb A1c procedure. For each dilution, samples were analyzed in duplicate. The tests were determined to be linear within the entire ranges studied for HbA<sub>1c</sub> hemoglobin fraction until a maximum concentration of about 127 mmol/mol (between 4.8 and 13.8 % HbA<sub>1c</sub>). In addition, 3 different characteristic blood samples, including a normal sample with HbA<sub>1c</sub> concentration at 31 mmol/mol (5.0 % HbA<sub>1c</sub>), a sample with HbA<sub>1c</sub> level close to the cut-off value at 46 mmol/mol (6.3 % HbA<sub>1c</sub>) and an elevated HbA<sub>1c</sub> level sample with HbA<sub>1c</sub> concentration at 79 mmol/mol (9.3 % HbA<sub>1c</sub>), were all serially diluted in hemolysing solution and electrophoresed with the MINICAP Hb A1c procedure. The tests were determined to be linear within the entire ranges studied from 2.5 to 31.1 g/dL total hemoglobin and HbA<sub>1c</sub> fraction concentration and percentage were not affected by the hemoglobin concentration of the samples.

### Accuracy – Internal correlation

The internal concordance study of the MINICAP Hb A1c procedure performed with the MINICAP FLEX-PIERCING instrument was evaluated in a study based on the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - USA) EP09-A2 guideline "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples ; Approved Guideline – Second Edition (Interim Revision)".

The results for HbA<sub>1c</sub> concentrations (mmol/mol) and percentages (%) were analyzed using statistical tools recommended by CLSI.

*NOTE : The results presented below have been obtained from 1 internal accuracy study. The analyzed blood samples were provided by 6 laboratories in France, the Netherlands and USA.*

*All the samples were exactly treated the same way with both techniques and followed the same guidelines in regards to sample integrity.*

The levels of HbA<sub>1c</sub> were measured in 105 blood samples, including 30 samples with normal HbA<sub>1c</sub> levels and 75 samples with elevated HbA<sub>1c</sub> levels, both by electrophoretic separations obtained with MINICAP Hb A1c procedure with the MINICAP FLEX-PIERCING instrument and a commercially available capillary electrophoresis technique for HbA<sub>1c</sub> quantification that is NGSP standardized.

The measured values of HbA<sub>1c</sub> concentrations and percentages from both procedures were analyzed by a linear regression statistical procedure. The obtained results have demonstrated a perfect correlation between both procedures for HbA<sub>1c</sub> quantification.

The results of linear regression analysis are tabulated below (y = MINICAP Hb A1c), the sensibility and specificity of the MINICAP Hb A1c procedure compared to the reference procedure have been calculated using the recommended method (Wending, 1986).

| HbA <sub>1c</sub>        | Correlation coefficient | y-Intercept | Slope | Range of values MINICAP Hb A1c | Sensibility (%) | Specificity (%) |
|--------------------------|-------------------------|-------------|-------|--------------------------------|-----------------|-----------------|
| Concentration (mmol/mol) | 0.998                   | 1.149       | 0.987 | 28 - 131                       | 100.0           | 96.7            |
| Percentage (%)           | 0.998                   | 0.128       | 0.987 | 4.7 – 14.2                     | 100.0           | 96.7            |

## BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAPHY

1. Abraham EC : Glycosylated hemoglobins - methods of analysis and clinical applications, *Clinical and Biochemical Analysis* 1985 ; Vol 19.
2. American Diabetes Association : Clinical practice recommendations : Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1999 ; 22 (suppl) : S32-41.
3. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes - 2012. *Diabetes Care*. 2012 Jan, 35, Suppl 1 : S11-S63.
4. Bridges KR *et al* : The acetylation of hemoglobin by aspirin *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest* 1975 ; 56 : 201-207.
5. Flückiger R *et al* : Hemoglobin carbamylation in uremia, *N Engl J Med* 1981 ; 304 : 823-827.
6. Garde AH, Hansen AM, Skovgaard LT *et al* : Seasonal and biological variation of blood concentrations of total cholesterol, dehydroepiandrosterone sulfate, hemoglobin Hb A1c, Ig A, prolactin, and free testosterone in healthy women. *Clin Chem* 2000 ; 46 : 551-559.
7. Geistanger *et al*. Statistical methods for monitoring the relationship between the IFCC reference measurement procedure for Hemoglobin A1c and the designated comparison methods in the United States, Japan, and Sweden. *Clin. Chem.*, 2008, 54, 8 : 1379-1385.
8. Goldsland I : Intra-individual variation : Significant changes in parameters of lipids and carbohydrate metabolism in the individual and intraindividual variation in different test populations. *Ann Clin Biochem* 1985 ; 22 : 618-624.
9. Goldstein DE *et al* : Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications, *Clin Chem* 1986 ; 32 : B64-B70.
10. Goldstein DE, Little R, England JD, Wiedmeyer H-M, Mc Kenzie EM. Methods for quantitating glycosylated hemoglobins: high performance liquid chromatography and thiobarbituric acid colorimetry. In: Clarke WL, Larner J, Pohl SL, eds. *Methods of diabetes research*, Vol. 2 Clinical methods. New York: John Wiley, 1986: 475-504.
11. Hanas R, John G. 2010 Consensus statement on the worldwide standardization of the Hemoglobin A1c measurement. *Clin. Chem.*, 2010.
12. Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO, Miedema K, Barr JR, Goodall I, Hoshino T, John WG, Kobold U, Little R, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Susanto F, Takei I, Thienpont L, Umemoto M, Wiedmeyer HM. IFCC Reference System for Measurement of Hemoglobin A1c in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method comparison study. *Clin. Chem.* 2004; 50: 166-174.
13. Jellum E *et al*. Diagnostic applications of chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B*, 689, 155-164 (1997).
14. Jeppsson OJ, Kobold U, Barr J *et al* : Approved IFCC reference method for the measurement of Hb A1c in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002 ; 40 : 78-89.
15. Jorde R, Dunsford J : Intra-individual variability and longitudinal changes in glycaemic control in patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2000 ; 17 : 451-456.
16. Kilpatrick ES, Maylor PW, Keevil BG : Biological variation of glycated hemoglobin. Implications for diabetes screening and monitoring. *Diabetes Care* 1998 ; 21 : 261-264.
17. Landers JP. Clinical Capillary Electrophoresis. *Clin. Chem.*, 41, 495-509 (1995).
18. Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM *et al* : for the NGSP Steering Committee. The national glycohemoglobin standardization program : A fiveyears progress report. *Clin Chem* 2001 ; 47 : 1985-1992.
19. Mayer TK and Freedman ZR : "Protein glycosylation in diabetes mellitus : a review of laboratory measurements and of their clinical utility" (critical review), *Clinica Chimica Acta* 1983 ; 127 : 147-184.
20. Oda RP *et al*. Capillary electrophoresis as a clinical tool for the analysis of protein in serum and other body fluids. *Electrophoresis*, 18, 1715-1723 (1997).
21. Phillipou G, Phillips PJ : Intraindividual variation of glycohemoglobin : Implications for interpretation and analytical goals. *Clin Chem* 1993 ; 39 : 2305-2308.
22. Ragnar Hanas, Garry John, and on behalf of the International HbA1c Consensus Committee : 2010 Consensus Statement on the Worldwide Standardization of the Hemoglobin A1c Measurement (Preamble). *Clin. Chem.*, Aug 2010 ; 56, 8 : 1362-1364.
23. Rohlfing C, Wiedmeyer HM, Little R *et al* : Biological variation of glycohemoglobin. *Clin Chem* 2002 ; 48 : 1116-1118.
24. Rolandsson O *et al* : Hemoglobin A1c can be analyzed in blood kept frozen at -80 °C and is not commonly affected by hemolysis in the general population. *Metabolism*, 2004 ; 53 (11) : 1496 - 1499.
25. Sacks DB, Brun DE, Goldstein DE *et al* : Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002 ; 48 : 436-472.
26. Schoos R *et al* : Les Hémoglobines Glycosylées, *Bull Soc Lux Biol Clin* 1981, No. 4.
27. Skeie S, Thue G, Sandberg S : Interpretation of hemoglobin A1c (Hb A1c) values among diabetic patients : Implications for quality specifications for Hb A1c. *Clin Chem* 2001 ; 47 : 1212-1217.
28. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependant diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1993; 329: 977-86.
29. Wendling A. Procédures de diagnostic ou de dépistage : Justification et validité d'un test de diagnostic ou de dépistage-sensibilité-spécificité. *Impact-Internat*, 1986 ; Sept : 93-97.

## SCHÉMAS / FIGURES

## PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES - ELECTROPHORETIC PATTERNS

Figure 1

Profil normal  
Normal pattern

HbA<sub>1c</sub> : 5.1 % - 33 mmol/mol

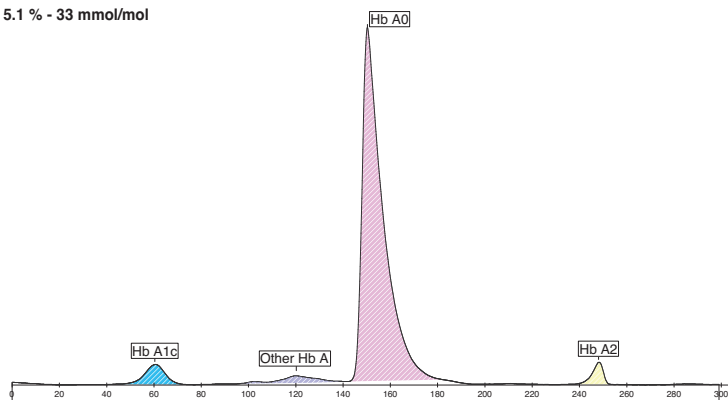
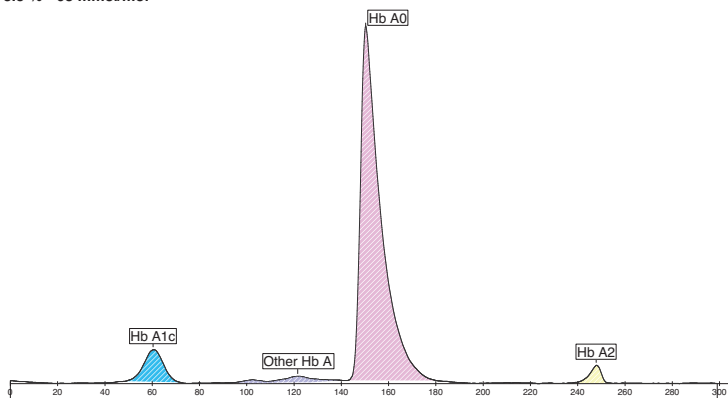


Figure 2

Profil avec HbA<sub>1c</sub> augmentée  
Pattern with elevated HbA<sub>1c</sub> level

HbA<sub>1c</sub> : 8.3 % - 68 mmol/mol



## SCHÉMAS / FIGURES

## PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES - ELECTROPHORETIC PATTERNS

Figure 3

Profil avec variant (Hb S suspectée)  
 Pattern with variant (suspected Hb S)

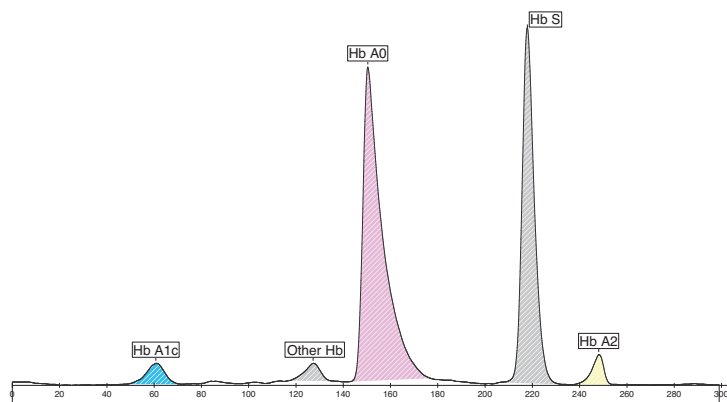
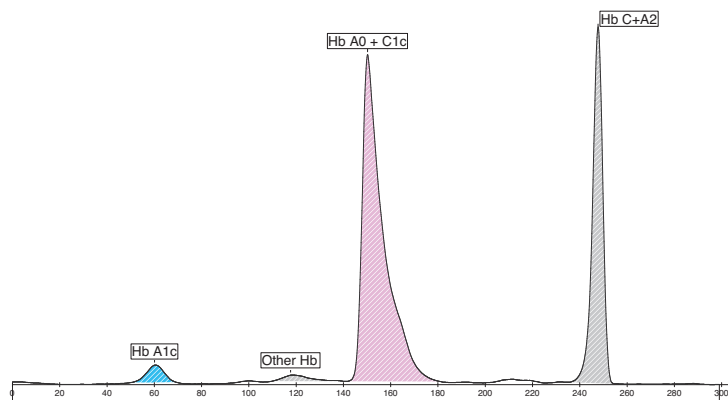


Figure 4

Profil avec variant (Hb C suspectée)  
 Pattern with variant (suspected Hb C)

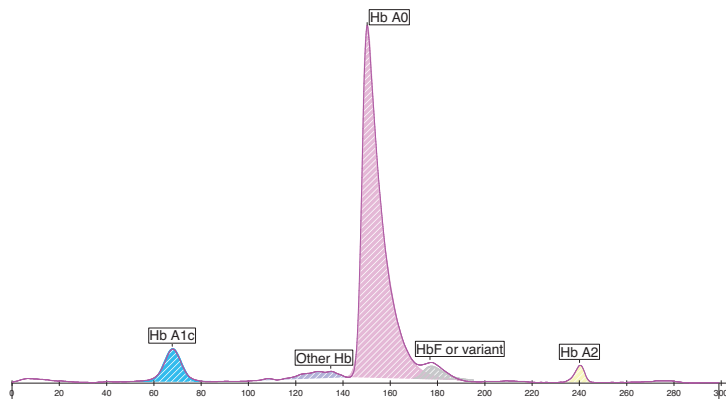


## SCHÉMAS / FIGURES

## PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES - ELECTROPHORETIC PATTERNS

Figure 5

Profil avec Hb F  
*Pattern with Hb F*





Parc Technologique Léonard de Vinci  
CP 8010 Lisses - 91008 EVRY Cedex - France  
Tél. : 33 (0)1 69 89 80 80 - e-mail : [sebia@sebia.com](mailto:sebia@sebia.com)

---

### **sebia Benelux SCS / Comm. V**

Jan Olleslagerslaan 41  
1800 Vilvoorde  
Belgique / België  
Tél. : 32 (0)2 702 64 64  
Fax : 32 (0)2 702 64 60  
e-mail : [sebia.benelux@sebia.be](mailto:sebia.benelux@sebia.be)

### **sebia Brasil**

Edifício Baker Office Tower  
Rua Barão do Triunfo, 73, conjunto 51  
CEP 04602-000  
Bairro Brooklin Paulista, São Paulo - SP  
Brasil  
Tel. : 55 11 3849 0148  
Fax : 55 11 3841 9816  
e-mail : [sebia@sebia.com.br](mailto:sebia@sebia.com.br)

### **sebia GmbH**

Münsterfeldallee, 6  
36041 Fulda  
Deutschland  
Tel. : 49 (0)661 3 30 81  
Fax : 49 (0)661 3 18 81  
e-mail : [sebia@sebia.de](mailto:sebia@sebia.de)

### **sebia Hispania S.A.**

C/Sicilia, n° 394  
08025 Barcelona  
España  
Tel. : 34 93 208 15 52  
Fax : 34 93 458 55 86  
e-mail : [sebia@sebia.es](mailto:sebia@sebia.es)

### **sebia Inc.**

400-1705 Corporate Drive  
Norcross, GA 30093  
U.S.A.  
Tel. : 1 770 446 - 3707  
Fax : 1 770 446 - 8511  
e-mail : [info@sebia-usa.com](mailto:info@sebia-usa.com)

### **sebia Italia S.r.l.**

Via Antonio Meucci, 15/a  
50012 Bagno a Ripoli (FI)  
Italia  
Tel. : 39 055 24851  
Fax : 39 055 2485400  
e-mail : [info@sebia.it](mailto:info@sebia.it)

### **sebia UK Ltd**

River Court, Meadows Business Park  
Station Approach, Blackwater  
Camberley, Surrey, GU17 9AB  
United Kingdom  
Tel. : 44 (0)1276 600636  
Fax : 44 (0)1276 38827  
e-mail : [info@sebia.co.uk](mailto:info@sebia.co.uk)

### **sebia**

Shanghai Representative Office  
Cross Tower, Room 2306-07  
318 Fuzhou Road  
Shanghai 200001  
China  
Tel. : 00 86 (21) 6350 1655  
Fax : 00 86 (21) 6361 2011  
e-mail : [sebia@sebia.cn](mailto:sebia@sebia.cn)